

Aus der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten an der Klinik für
Innere Medizin der Universität Rostock

Leiter: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

In-vitro-Untersuchungen über die Rolle verschiedener Blutzellen bei der
Entwicklung des Endothelschadens bei Malaria tropica

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Manja Kratzius,

geb. in Stendal

aus Eisenach

Rostock, 2009

- Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger
1. Gutachter: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger
Universitätsklinikum Rostock,
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin,
Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten
2. Gutachter: Prof. Dr. med. V. Kiefel
Universitätsklinikum Rostock,
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin,
Abteilung für Transfusionsmedizin
3. Gutachter: Prof. Dr. med. T. Weinke
Ernst von Bergmann Klinikum Potsdam
Klinik für Gastroenterologie und Infektiologie

Verteidigt am 10.02.2010

1	Einleitung	1
1.1	Malaria	1
1.1.1	Epidemiologie und Erreger der Malaria	1
1.1.2	Entwicklungszyklus der Plasmodien	3
1.1.3	Klinische Aspekte der Malaria	4
1.1.4	Diagnostik der Malaria	6
1.1.5	Therapie der Malaria	6
1.1.6	Prophylaxe der Malaria und notfallmäßige Selbstbehandlung	9
1.2	Die physiologische und pathophysiologische Funktion des Gefäßendothels	10
1.3	Pathomechanismen bei Malaria	12
1.3.1	Endothelaktivierung bei Malaria	12
1.3.2	Die Bedeutung verschiedener Zytokine bei Malaria	12
1.3.3	Die Bedeutung verschiedener Blutzellpopulationen bei Malaria	14
1.4	Zelltod: Nekrose und Apoptose	17
1.4.1	Pathophysiologie der Nekrose	17
1.4.2	Pathophysiologie der Apoptose	18
1.5	Fragestellung	19
2	Material, Methoden und Patienten	21
2.1	Patienten	21
2.2	Gewinnung der Seren von Patienten und Probanden	21
2.3	Endothelzellkultur (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)	22
2.4	Isolierung einzelner Blutzellpopulationen	22
2.4.1	Isolierung neutrophiler Granulozyten	23
2.4.2	Isolierung mononukleärer Zellen	23
2.4.3	Isolierung der Erythrozyten	24
2.4.4	Isolierung von Thrombozyten	24
2.5	Experimente	24
2.6	Färbung der Endothelzellen zum Nachweis von Apoptose mittels TUNEL-Reagenz	25
2.7	Auswertung und Darstellung	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Inkubation von Endothelzellkulturen aus menschlichen Nabelschnurvenen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells - HUVEC) mit Patienten- oder Kontrollserum in Anwesenheit oder Abwesenheit verschiedener Blutzellpopulationen	28
3.1.1	Malaria tropica mit tödlichem Verlauf	28
3.1.2	Malaria tropica mit nicht tödlichem, kompliziertem Verlauf	29
3.2	Inkubation von HUVEC mit Patientenserum und Neutrophilen	30
3.3	Inkubation von HUVEC und Neutrophilen mit dem Serum eines Patienten mit tödlicher Malaria tropica: Wirkung von Tocopherol, Ascorbinsäure, Ulinastatin, Gabexat-Mesilat und Pentoxifyllin	31
3.4	Inkubation von HUVEC und Neutrophilen mit dem Serum eines Patienten mit tödlicher Malaria tropica: Wirkung von Anti-TNF- α -Antikörper	35
3.5	Inkubation von HUVEC mit Patientenserum und Neutrophilen unter Verwendung einer permeablen Membran	36
3.6	Inkubation von HUVEC mit mononukleären Zellen und Patientenserum und die Wirkung verschiedener Hemmstoffe	37

3.6.1	Wirkung von mononukleären Zellen auf die Apoptoserate des Endothels bei Malaria tropica mit tödlichem bzw. nicht tödlichem, kompliziertem Verlauf	38
3.6.2	Wirkung von mononukleären Zellen auf die Apoptoserate des Endothels bei Malaria tropica mit kompliziertem, nicht tödlichem bzw. tödlichem Verlauf und der Einfluss von Hemmstoffen	39
4	Diskussion	42
4.1	Diskussion der Methodik	42
4.1.1	Gewinnung und Kultivierung der Endothelzellen	42
4.1.2	Isolation von Blutzellen	42
4.1.3	Pharmaka	43
4.1.4	Apoptosenachweis	43
4.2	Genese des Endothelschadens bei Malaria	44
4.3	Die Rolle unterschiedlicher Blutzellpopulationen und die Rolle von TNF- α bei der Entstehung von Endothelschaden bei Malaria tropica	44
4.3.1	Erythrozyten und Endothelschaden bei Malaria	45
4.3.2	Thrombozyten und Endothelschaden bei Malaria	46
4.3.3	Mononukleäre Zellen und Endothelschaden bei Malaria	46
4.3.4	Neutrophile Granulozyten und Endothelschaden bei Malaria, Bedeutung der direkten Wechselwirkung mit dem Endothel und der Aktivierung durch TNF- α	47
4.3.5	Induktion von Endothelzellapoptose durch Patientenserum	49
4.4	Wirkung verschiedener Hemmsubstanzen auf die Verhinderung der Endothelapoptose unter dem Einfluss neutrophiler Granulozyten	49
4.4.1	Ascorbinsäure	49
4.4.2	Tocopherol	50
4.4.3	Ulinastatin	50
4.4.4	Gabexat-Mesilat	51
4.4.5	Pentoxifyllin (POF)	51
4.4.6	Kombination von Ulinastatin und Ascorbinsäure	52
4.5	Wirkung verschiedener Hemmsubstanzen auf die Verhinderung der Endothelapoptose in Anwesenheit und Abwesenheit mononukleärer Zellen	53
5	Zusammenfassung	54

Anhang

Material

Literatur

Abkürzungsverzeichnis

Thesen

Selbständigkeitserklärung

Danksagung

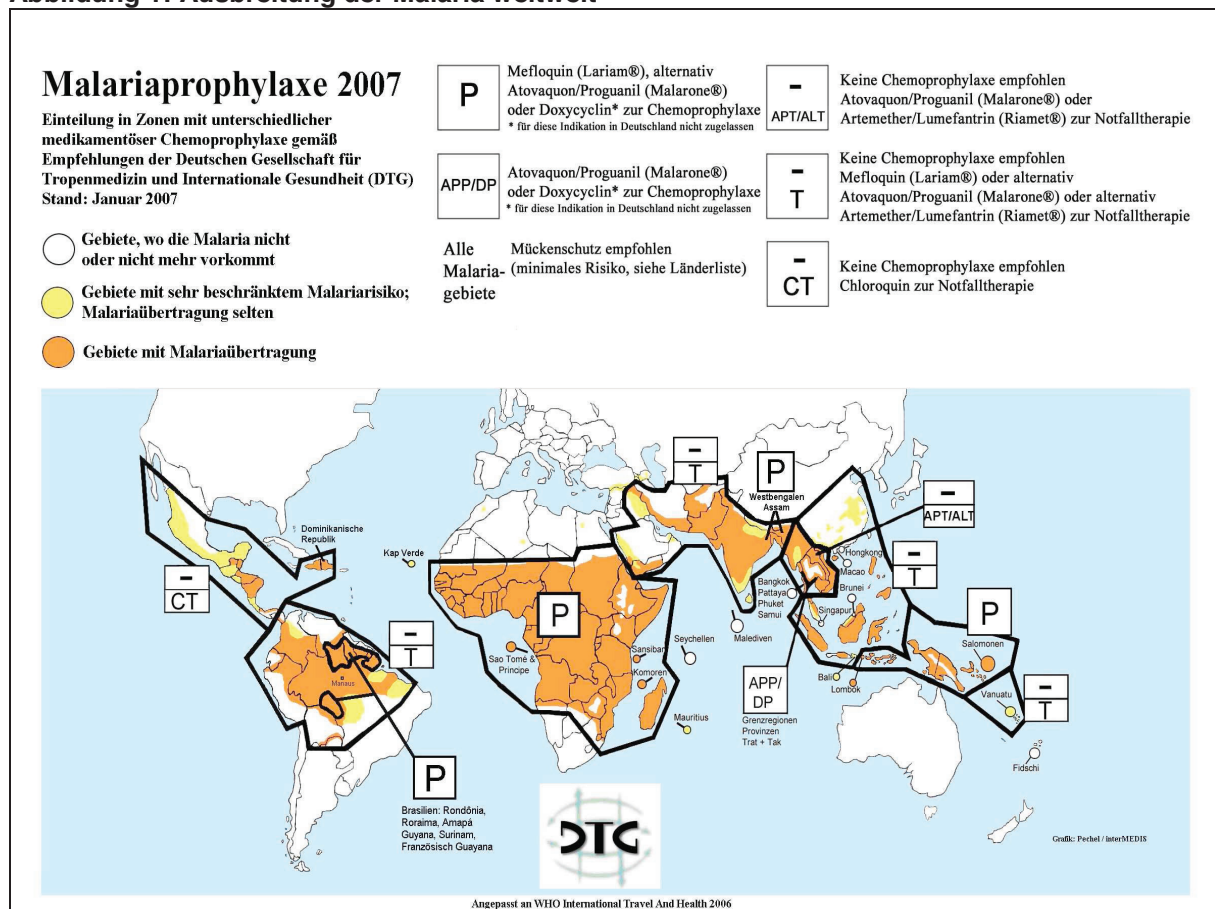
1 Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Epidemiologie und Erreger der Malaria

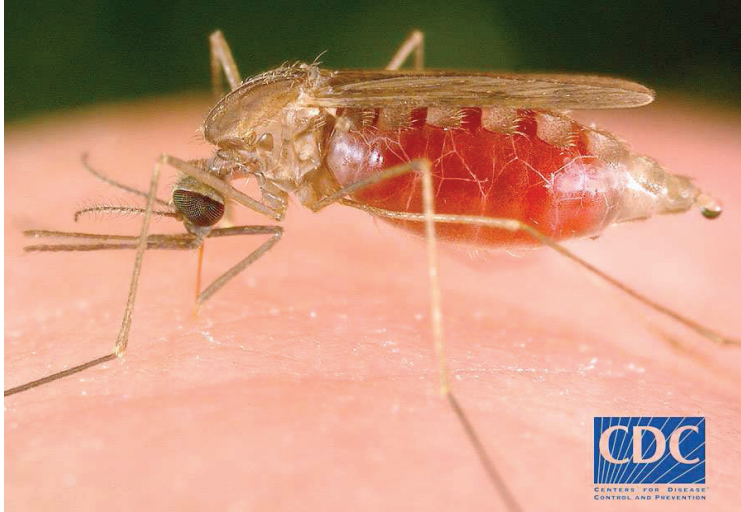
Malaria ist weltweit die häufigste parasitäre Infektionskrankheit. Sie kommt im tropischen und subtropischen Raum (Afrika, Südostasien, Indien, Indonesien, Neuguinea, Salomon-Inseln, Mittel- und Südamerika, Hispaniola und Teilen des Nahen und Mittleren Ostens) vor (s. Abb. 1). Die World Health Organization (WHO) schätzt die Inzidenz der Malaria auf 300 bis 500 Millionen Fälle pro Jahr. Die Anzahl der jährlichen Todesfälle beträgt nach Angaben des Robert Koch Instituts 1,5 bis 2,7 Millionen weltweit (s. World Malaria Report, 2005).

Abbildung 1: Ausbreitung der Malaria weltweit



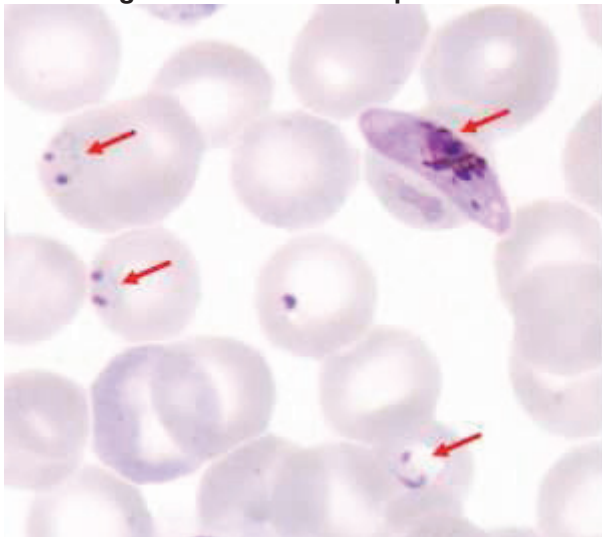
Ursache der Malariaerkrankung ist eine Infektion des Organismus mit Plasmodien. Plasmodien werden den humanpathogenen Blut- und Gewebepprotozoen zugeordnet und werden durch den Stich der weiblichen Anophelesmücke (s. Abb. 2) auf den Menschen übertragen.

Abbildung 2: Anophelesmücke



Quelle: Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

Abbildung 3: Plasmodium falciparum



Zu sehen sind Formen der erythrozytären Vermehrung sowie ein Gametozyt, Giemsa-Färbung.
Quelle: Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

Es werden vier humanpathogene Plasmodienarten und drei Krankheitsformen der Malaria unterschieden:

Die Malaria tropica, die schwerste Form der Malaria, wird durch Plasmodium falciparum (*P. falciparum*, s. Abb. 3) verursacht. Die Malaria tertiana kann durch

Plasmodium ovale (P. ovale) und Plasmodium vivax (P. vivax) verursacht werden. Die Malaria quartana wird durch die Infektion mit Plasmodium malariae (P. malariae) verursacht.

1.1.2 Entwicklungszyklus der Plasmodien

Durch den Stich der infizierten Anophelesmücke gelangen Sporozoiten über die menschliche Blutbahn in die Leber, wo sie in Hepatozyten eindringen. Nach Heranreifen zum Schizonten und Teilung in mehrere Tausend Merozoiten (exoerythrozytäre Schizogonie), setzt der befallene Hepatozyt die Merozoiten in den Blutkreislauf frei. Diese Phase dauert mindestens 5½ Tage bei Malaria tropica, 8 bis 9 Tage bei Malaria tertiana und 15 Tage bei Malaria quartana. Über Endozytose gelangen die Merozoiten in die Erythrozyten. Es folgt die erythrozytäre Schizogonie (asexuelle Vermehrungsform). Dabei reift der Merozoit zunächst zum Trophozoit, dann zum Schizont. Jeder Schizont wiederum teilt sich in 8 bis 32 Merozoiten, abhängig vom infizierenden Plasmodium-Typ. Die Schizonten werden durch Hämolyse der parasitierten Erythrozyten freigesetzt und befallen die nächste Generation Erythrozyten (s. auch Abb. 4). Der erythrozytäre Vermehrungszyklus von Plasmodium falciparum dauert 36 bis 48 Stunden, bei Plasmodium vivax und ovale 48 Stunden und bei Plasmodium malariae 72 Stunden.

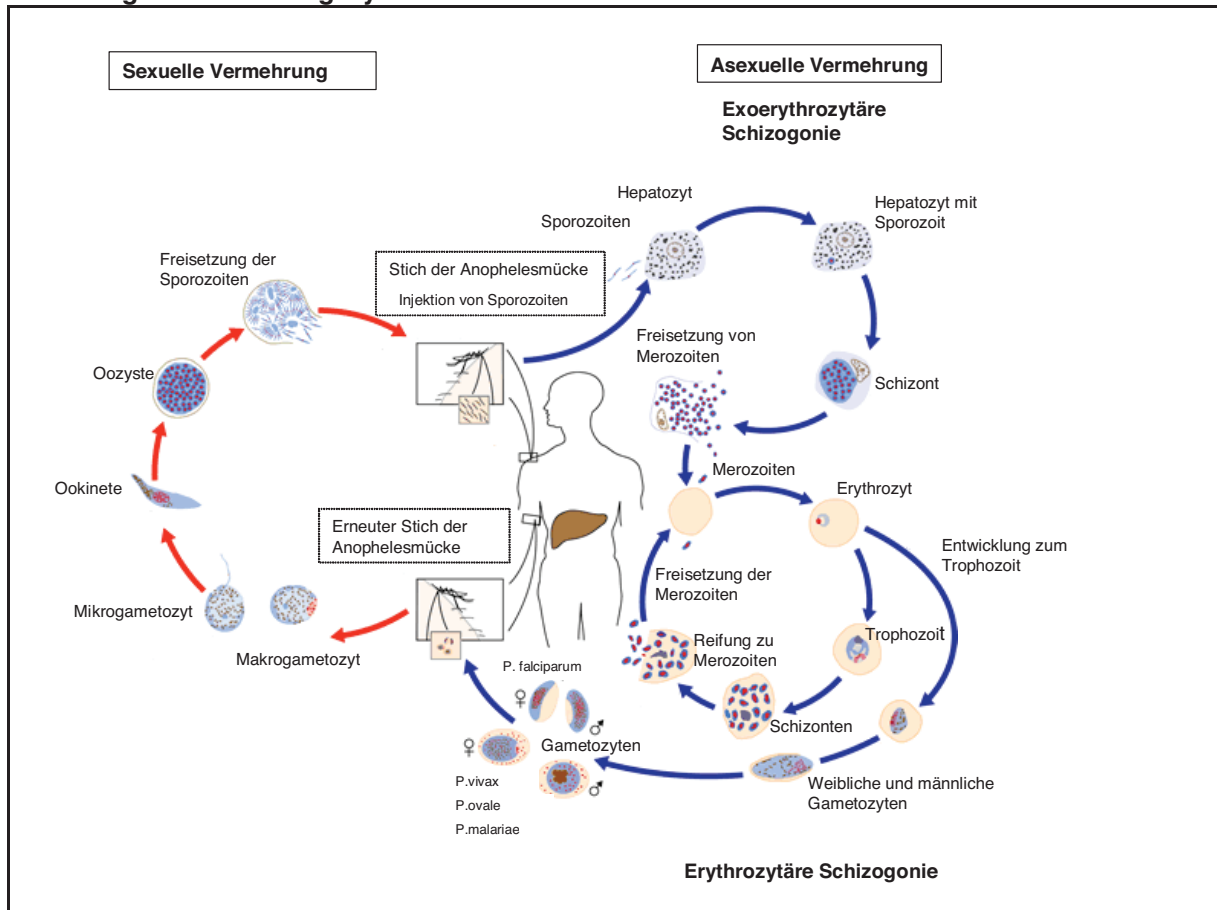
Zeitgleich mit dem Zerplatzen der befallenen Erythrozyten und der Freisetzung der Merozoiten treten grippeähnliche Symptome wie Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen auf.

Ein Teil der in den Erythrozyten gebildeten Merozoiten reift im Blut zu männlichen (Mikrogametozyten) und weiblichen (Makrogametozyten) Gametozyten. Diese werden von der weiblichen Anophelesmücke, die sowohl Vektor als auch Endwirt ist, bei einem erneuten Stich aufgenommen und reifen zu Gameten.

Im Gastrointestinaltrakt der Mücke verschmelzen dann weibliche Makrogameten und männliche Mikrogameten (sexuelle Phase der Vermehrung, Sporogonie) und bilden eine Zygote. Diese entwickelt sich über Zwischenstadien (Ookinete, Oozyste) zu Sporozoiten, die wiederum für den Menschen infektiös sind.

Bei *P. vivax* und *P. ovale* reifen während der exoerythrozytären Schizogonie einige Parasiten nicht sofort zu Schizonten, sondern verbleiben als sog. Hypnozoiten in der Leber. Diese können zu Spätrezidiven führen.

Abbildung 4: Vermehrungszyklus von Plasmodien



Nach: Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

1.1.3 Klinische Aspekte der Malaria

Die Inkubationszeit der Malariaerkrankung ist speziesabhängig und variiert zwischen 7 und 50 Tagen, in seltenen Fällen kann die Inkubationszeit über ein Jahr betragen (s. Tab. 1).

Zu Beginn der Erkrankung bietet der Patient oft uncharakteristische Symptome wie plötzlich einsetzendes hohes, meist periodisch verlaufendes Fieber, Schüttelfrost, gastrointestinale Beschwerden (fiebrhafte Diarrhö), Erbrechen, Benommenheit, Kopf-, Glieder- und Rückenschmerzen (Myalgien). Auch bei milden Verlaufsformen kann es zum Auftreten von Anämie, Hepato- und Splenomegalie und einem leichten Ikterus kommen (Weatherall et al., 2002).

Während bei Malaria tertiana typischerweise jeden zweiten und bei Malaria quartana jeden dritten Tag Fieber auftritt, kommen bei der Malaria tropica unterschiedliche Fiebrerrhythmen vor.

Der klinische Verlauf der Malaria wird durch genetische Eigenschaften des Parasiten (u. a. Neigung zur Adhärenz parasitierter Erythrozyten am Gefäßendothel sowie Medikamentenresistenz) und des Wirtes beeinflusst. Ferner spielen Semiimmunität, Alter, Schwangerschaft und kulturelle sowie ökonomische Faktoren eine Rolle (Miller et al., 2002).

Tabelle 1: Charakteristika der Malariaerkrankungen

Plasmodium	Regelinkubationszeit	Malariaform	Teilungsdauer/Fieberanfälle
P. falciparum	7 – 30 Tage	Malaria tropica	unregelmäßig
P. malariae	16 – 50 Tage	Malaria quartana	72 Stunden
P. ovale	12 – 18 Tage	Malaria tertiana	48 Stunden
P. vivax	12 – 18 Tage	Malaria tertiana	48 Stunden

In seltenen Fällen sind bei allen Parasitenspezies Inkubationszeiten über ein Jahr möglich, v.a. bei Rezidiven der Malaria tertiana durch Leber-Hypnozoiten.

Mindestens 5 bis 10 Millionen Menschen sind jährlich von Komplikationen der Malaria tropica betroffen. Die Gesamtmortalität liegt zwischen 15 % und 30 %, wobei cerebrale Malaria, Lungenödem und metabolische Azidose mit einer besonders hohen Mortalität einhergehen (Ho und White, 1999).

Komplizierend wirken sich auch die Anämie infolge von Hämolyse und Hemmung der Erythropoese (Ho und White, 1999; Miller et al., 2002; Weatherall et al., 2002), die Thrombozytopenie und eine Aktivierung der Gerinnung aus. Ein Übergang in eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) ist jedoch selten (Horstmann und Dietrich, 1981 und 1985). Infolge der Anämie und der rheologischen Veränderungen kommt es zur Einschränkung von Organfunktionen und letztlich zum Organversagen, z. B. einem akuten Nierenversagen (Ho und White, 1999; Miller et al., 2002; Weatherall et

al., 2002). Im weiteren Verlauf kann sich innerhalb weniger Tage ein Multiorganversagen manifestieren.

1.1.4 Diagnostik der Malaria

Fieber oder grippeartige Allgemeinsymptome nach einem Tropenaufenthalt sollten Anlass zum Ausschluss einer Malariaerkrankung geben.

Bei der körperlichen Untersuchung kann ab dem 5. bis 7. Tag eine Splenomegalie nachweisbar sein.

Basisdiagnostik ist die Mikroskopie zum Nachweis von Plasmodien im dünnen Blutaussstrich und im Dicken Tropfen (Goldstandard). Diese Präparate werden in der Regel nach Giemsa gefärbt.

Andere Methoden zum Parasitennachweis haben sich aufgrund der hohen Kosten und der hohen Sensitivität und Spezifität der Basisdiagnostik (Ausstrich, Dicker Tropfen) in der Praxis nicht durchgesetzt. Zu erwähnen sind der immunchromatografische Nachweis von *P. falciparum*-histidine rich protein 2 (PfHRP-2) und anderer Parasitenproteine in einem Schnelltest, die Bestimmung der parasitenspezifischen Laktatdehydrogenase (pLDH), die QBC-Methode (engl.: „quantitative Buffy coat“) und der Nachweis plasmodienspezifischer DNA (engl.: desoxyribonucleid acid) mittels PCR (engl.: polymerase chain reaction).

Die weitere Diagnostik schließt ein großes Blutbild, die tägliche Kontrolle der Parasitämie, die Bestimmung von Thrombozytenzahl, Blutzucker, Elektrolyten, Leber- und Nierenparametern sowie die Bestimmung des Gerinnungsstatus, die Blutgasanalyse und apparative Diagnostik (EKG, Röntgen Thorax, Abdomensonographie) ein. Bei der kompliziert verlaufenden Malaria wird weiterhin die engmaschige Kontrolle von Atemfrequenz, Puls, Blutdruck sowie der Ein- und Ausfuhr empfohlen.

1.1.5 Therapie der Malaria

Die Therapie ist abhängig von der Plasmodienart (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum*) und somit der Form der Malaria (*M. tertiana*, *M. quartana* und *M. tropica*).

Des Weiteren spielt das Infektionsgebiet (Resistenzen), die medikamentöse Prophylaxe sowie der Schweregrad der Erkrankung, vor allem bei *Malaria tropica* eine entscheidende Rolle.

Weitere Kriterien, die bei der Therapie berücksichtigt werden müssen, sind bekannte Allergien oder Medikamentenunverträglichkeiten, Begleiterkrankungen oder aber das Vorliegen einer Schwangerschaft.

Bei der *Malaria tertiana* und der *Malaria quartana* ist oral verabreichtes Chloroquin das Mittel der Wahl. In Papua-Neuguinea und Irian Jaya sowie in Teilen Indochinas kommen jedoch Resistenzen von *P. vivax* gegen Chloroquin vor. Daher ist bei einer *M. tertiana*, die in diesen Gebieten erworben wurde, die Anwendung von anderen Malariamedikamenten, zum Beispiel Mefloquin, erforderlich.

Bei allen Patienten mit *M. tertiana*, die nicht in Endemiegebieten wohnen, ist zur Rezidivprophylaxe eine Nachbehandlung mit Primaquine, das gegen die Leberschizonten wirkt, erforderlich. Vor der Gabe von Primaquine sollte ein Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel wegen der Gefahr einer hämolytischen Anämie ausgeschlossen werden.

Wenn keine Komplikationen und keine Hinweise auf eine drohende Milzruptur vorliegen, kann die Therapie bei *Malaria tertiana* und bei *Malaria quartana* häufig ambulant erfolgen (Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit e.V.).

Die Behandlung der *Malaria tropica* erfolgt bevorzugt stationär. Bei unkompliziert verlaufender *Malaria tropica* ist Chloroquin Mittel der Wahl, sofern die Infektion des Patienten in einem Gebiet ohne bekannte Chloroquin-Resistenz erworben wurde (Mittelamerika bis Panamakanal, Hispaniola). Bei Chloroquin-Resistenz erfolgt die Behandlung in der Regel mit Mefloquin (Lariam[®]), mit Atovaquon/Proguanil (Malarone[®]) oder mit Artemether/Lumefantrin (Riamet[®]).

Im Grenzgebiet Thailands zu Myanmar und Kambodscha kommen gehäuft Resistenzen gegen Mefloquin vor. Eine in Indochina erworbene Malaria tropica sollte daher nicht mit Mefloquin behandelt werden.

Aus Afrika ist vereinzelt über Resistenzen gegen Atovaquon/Proguanil und Mefloquin berichtet worden.

Die Therapie der komplizierten Malaria tropica erfolgt mit Chinin (Chininum dihydrochloricum) per infusionem, aufgrund genannter Komplikationen (ZNS-Beteiligung, Nierenbeteiligung und anderer Organkomplikationen) sowie möglicher schwerer Nebenwirkungen (hyperinsulinämische Hypoglykämie, Lebertoxizität, Herzrhythmusstörungen u.a.) nach Möglichkeit unter intensivmedizinischer Überwachung. In den USA erfolgt die Therapie der komplizierten M. tropica mit Chinidin, da Chinin dort nicht zugelassen ist.

Zur Vermeidung von Rekrudeszenzen wird in der Regel zusätzlich Doxycyclin für 7 Tage gegeben, alternativ Clindamycin, v. a. bei Erkrankungen, die in Afrika, Südostasien oder Ozeanien erworben wurden.

Bei zunehmenden Resistenzen steht seit kurzem Artesunat zur intravenösen Therapie in Kombination z. B. mit Chloroquin, Amodiaquin, einem Chloroquin ähnlichen Arzneistoff, oder Mefloquin zur Verfügung.

Supportive Maßnahmen ergänzen die antiparasitäre Therapie bei der komplizierten Malaria tropica. Sie umfassen die Überwachung des Flüssigkeitshaushaltes und der Funktion lebenswichtiger Organe (Gehirn, Lunge, Niere, Herz und Leber) sowie die Therapie von Anämie, Störungen des Glukosehaushalts und Fieber.

Es gibt bisher keine allgemein als wirksam anerkannte supportive medikamentöse Therapie. Die Gabe von Steroiden ist kontraindiziert, und Substanzen wie Heparin und Pentoxifyllin erbringen keinen klinischen Nutzen (Warrell et al., 1982; Hoffman et al., 1988; Hemmer et al., 1991; Hemmer et al., 1997).

1.1.6 Prophylaxe der Malaria und notfallmäßige Selbstbehandlung

Um das Risiko einer Malaria und die möglichen Komplikationen einer Infektion so gering wie möglich zu halten, sollten bei Reisen in Endemiegebiete Schutzmaßnahmen (Expositionsprophylaxe und Chemoprophylaxe) getroffen werden.

Expositionsprophylaxe bezeichnet die Vermeidung von Insektenstichen. Ihr kommt angesichts der Resistenzentwicklung bei der Chemoprophylaxe besondere Bedeutung zu. Bei einer Reise in betroffene Gebiete kann durch die Anwendung von Moskitonetzen, durch das Tragen von hautbedeckender heller Kleidung, durch das Einreiben unbedeckter Hautstellen mit mückenabweisenden Mitteln (Repellents mit den Wirkstoffen DEET und Icaridin) und durch den Aufenthalt in mückensicheren Räumen (Klimaanlage oder Insektengitter) eine Expositionsprophylaxe erfolgen. Zusätzlich kommen Insektizide auch zur Imprägnierung von Moskitonetzen und Kleidungsstücken (zum Beispiel mit Permethrin) zur Anwendung.

Die Chemoprophylaxe (medikamentöse Vorbeugung) ist abhängig vom Reiseziel, der Reisezeit, der Reisedauer und dem Reisetil. Sie sollte unter Berücksichtigung von Vorerkrankungen, Unverträglichkeiten und bestehender Medikation erfolgen. Durch die zunehmende Verbreitung von Resistenzen bei *P. falciparum* ist die Chemoprophylaxe deutlich erschwert (s. Abb. 1).

Chloroquin ist aufgrund der Resistenzentwicklung in fast allen Malariagebieten als Prophylaxe unbrauchbar geworden. Auch die häufige Mefloquin-Resistenz in Indochina ist bei Prophylaxeentscheidungen zu berücksichtigen. Vereinzelte Resistenzen gegen Atovaquon/Proguanil haben zur Zeit noch keine praktische Bedeutung.

Eine Chemoprophylaxe ist in Gebieten mit intensiver Malariaübertragung sinnvoll und kann das Risiko auch in Regionen mit multiresistenten Malaria tropica-Erregern wesentlich reduzieren. Hierfür kommen Mefloquin, Atovaquon/Proguanil oder Doxycyclin zum Einsatz. Doxycyclin ist in Deutschland nicht als Malaria-Prophylaxe zugelassen, kann aber, nach sorgfältiger Aufklärung des Reisenden verwendet werden (Off-Label-Use). Ungeeignet zur Prophylaxe sind Medikamente mit kurzer

Halbwertszeit (Chinin, Halofantrin, Artemisinin-Derivate) und sulfonamidhaltige Präparate wie Sulfadoxin/Pyrimethamin (Fansidar®) und Dapson/Pyrimethamin (Maloprim®), letztere auch aufgrund erheblicher Nebenwirkungen bei Dauereinnahme (Lyell-Syndrom bei Fansidar®).

Bei Auftreten von malariaverdächtigen Symptomen kann, sofern innerhalb von 24 Stunden kein Arzt erreichbar ist, eine Selbstbehandlung durchgeführt werden. Entsprechend Resistenzlage kommen Chloroquin, Mefloquin, Atovaquon/Proguanil oder Artemether/Lumefantrin zur Anwendung. Nach jeder, auch erfolgreichen Selbstbehandlung, ist eine ärztliche Vorstellung notwendig.

1.2 Die physiologische und pathophysiologische Funktion des Gefäßendothels

Das Endothel gewährleistet den kontrollierten Austausch von Nährstoffen und Flüssigkeit zwischen dem Blutkreislauf und dem Gewebe. Zudem ist das Endothel beteiligt an der Steuerung von Blutgerinnung (Hämostase und Fibrinolyse, Thrombozytenaggregation und Thrombozytenaggregationshemmung), Organdurchblutung (Vasodilatation und -konstriktion) und immunologischen Prozessen (Lüscher & Barton, 1997).

Unter physiologischen Bedingungen ist der Gefäßtonus niedrig. Das Gefäßendothel hemmt die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten, es unterdrückt die Aktivierung der Blutgerinnungskaskade und unterstützt gleichzeitig die Fibrinolyse. Das Endothel antagonisiert weiterhin inflammatorische Prozesse. So hemmt es zum Beispiel durch Mediatoren wie Stickoxid (NO), Interleukin 10 (IL-10) und Adenosin die Aktivierung und Adhäsion von Leukozyten am Endothel (Becker et al., 2000).

Bei Infektionen und Entzündungen wird das Endothel aktiviert. Es kommt zur Verschiebung der Homöostase, es überwiegen jetzt proinflammatorische und prokoagulatorische Eigenschaften (Cotran & Pober 1990; Becker et al., 2000).

Dabei kann das Endothel einerseits durch Mediatoren aktiviert werden, die sowohl von Leukozyten (Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten) als

auch vom Endothel selbst gebildet werden. Zu diesen Mediatoren gehören eine Vielzahl von Zytokinen (z. B. Interferon (IFN) α , β und γ , Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α), die Interleukine (IL) 1, 4 und 6) und Wachstumsfaktoren - z. B. Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl.: Fibroblast Growth Factor, FGF) und der Gefäß-Endothel-Wachstumsfaktor (engl.: Vascular Endothelial Cell Growth Factor, VEGF; Pober & Cotran, 1990).

Andererseits kann das Endothel auch durch die Bindung von Leukozyten aktiviert werden. Dabei binden Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten an Adhäsionsmolekülen auf der Endothelzelloberfläche (Rubanyi, 1993). Dies führt zur verstärkten Expression weiterer Adhäsionsmoleküle (wie Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), E-Selektin und P-Selektin) am Endothel, die ihrerseits die Bindung von Leukozyten am Endothel verstärken.

Über ICAM-1 können Neutrophile und B-Lymphozyten (Cotran & Pober, 1990), über VCAM-1 vor allem Lymphozyten, Monozyten und eosinophile Granulozyten am Endothel binden (Elhassan et al., 1994; Jakobsen et al., 1994; Bevilacqua et al., 1994). Ein besonders wichtiges Adhäsionsmolekül für neutrophile und eosinophile Granulozyten ist E-Selektin. Es interagiert ferner mit Monozyten und einigen Lymphozyten (memory T-Zellen- Subklasse; Jakobsen, 1994).

In der frühen Phase der Endothelaktivierung kommt es weiterhin zur Expression von P-Selektin und zur Freisetzung des von Willebrand-Faktors (vWF). Dies führt zur Thrombozyten-Leukozyten-Koaggregation (Becker et al., 2000). Zudem wird die Aktivierung adhärrierender Thrombozyten am Endothel durch das Einlagern des Plättchen aktivierenden Faktors (PAF) in die Endothelzellmembran verstärkt. Im Rahmen der Immunantwort kann dabei die lokalisierte Formation von Thrombin und Fibrin zum Endothelschaden führen (Becker et al., 2000).

Des Weiteren setzen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten toxische Substanzen frei, insbesondere proteolytische Enzyme und reaktive Sauerstoffspezies, und bewirken so eine Schädigung der Endothelzellen, die bis zum Zelluntergang führen kann. Ferner können Endothelzellen infolge einer Aggregation

von polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten (PMN) zerstört werden (Talbot et al., 1994).

Der Endothelschaden kann seinerseits die Entzündungsreaktion verstärken. Geschädigte Endothelzellen erhöhen ferner die Thrombogenität (Bombeli et al., 1997). In der Folge kommt es zu Hypoperfusion und zum (Mikro-) Gefäßverschluss. Dieser führt zu lokaler Ischämie und somit zur Endorganschädigung (Lüscher & Barton, 1997).

1.3 Pathomechanismen bei Malaria

1.3.1 Endothelaktivierung bei Malaria

Sowohl bei der milden als auch bei der schweren Verlaufsform von *M. tropica* ist das Endothel aktiviert (Kern et al., 2000; Turner et al., 1998). Dabei sind vor allem die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin auf der Endothelzelloberfläche (Turner et al., 1998; Silamut et al., 1999) und im Gewebe (Turner et al., 1994) verstärkt exprimiert und in ihrer löslichen Form vermehrt im Serum nachweisbar. Die Serumkonzentration von löslichem ICAM-1, löslichem E-Selektin und löslichem VCAM-1 ist bis zu neunfach erhöht (Boehme et al., 1994). Dabei korreliert die Plasmakonzentration der Adhäsionsmoleküle mit dem Schweregrad der Malaria.

Der Nachweis einer verstärkten Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und VCAM-1 gilt als charakteristisch für die Endothelaktivierung (Silamut et al., 1999). Kommt es zu einer vermehrten Expression aller Adhäsionsmoleküle, einschließlich ICAM-1, ist ein Endothelschaden wahrscheinlich (Boehme et al., 1994).

Somit weisen erhöhte Konzentrationen der genannten Adhäsionsmoleküle im Serum nicht nur auf eine Endothelaktivierung, sondern auch auf eine Endothelschädigung bei Malaria hin.

1.3.2 Die Bedeutung verschiedener Zytokine bei Malaria

Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen. Bei Malaria werden zahlreiche Zytokine,

korrelierend mit dem Schweregrad, vermehrt exprimiert (Perkins et al., 2000) und so die inflammatorische Situation moduliert.

Interleukin 1 (IL-1) ist ein proinflammatorisches Zytokin. Sowohl seine membranständige Form IL-1 α , als auch seine sezernierte Form IL-1 β sind bei Malaria tropica vermehrt nachweisbar. In vitro induzieren *P. falciparum*-Antigene die Synthese von IL-1 α (Prada et al., 1995) und IL-1 β (Pichyangkul et al., 1994) durch Makrophagen. Als Autokrin stimuliert es die weitere Produktion und Freisetzung seiner selbst durch Endothelzellen. Darüber hinaus stimuliert es die Freisetzung weiterer proinflammatorischer Zytokine und verstärkt die Expression von Adhäsionsmolekülen, vor allem von VCAM-1 und E-Selektin (Shimizu et al., 1991). Dabei wirkt es synergistisch mit TNF- α . Bei Patienten mit Malaria tropica korreliert der IL-1-Plasmaspiegel mit dem Plasmaspiegel von TNF- α und mit dem Schweregrad der Malariaerkrankung (Kwiatkowski et al., 1990).

TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha) nimmt als proinflammatorisches Zytokin eine zentrale Rolle im septischen Schock und bei der komplizierten Malaria tropica ein. Es wird von Monozyten und Makrophagen nach Stimulation mit Plasmodienantigenen in vitro und in vivo produziert (Bate et al., 1988 und 1989; Taverne et al., 1990a und 1990b). Auch Th1-Lymphozyten können TNF- α produzieren (Boehme et al., 1994). TNF- α induziert seinerseits die Leukozytenadhäsion, -aggregation und -aktivierung sowie die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und proteolytischen Enzymen durch Granulozyten. Da Letztere vor allem Malariaparasiten, aber auch Endothelzellen schädigen (Cotran & Pober, 1990), trägt TNF- α einerseits zur Bekämpfung der Malariaparasiten (Taverne et al., 1987), andererseits auch zur Entwicklung von Komplikationen im Wirtsorganismus bei (Grau et al., 1987; Grau et al., 1989a und 1989b). Bei Patienten mit Malaria tropica korreliert der Plasmaspiegel von TNF- α mit der Parasitämie und dem klinischen Schweregrad der Erkrankung (Kern et al., 1989; Grau et al., 1989a und 1989b; Kwiatkowski et al., 1990). Im Tiermodell (*P. berghei*-Malaria der Maus) konnten cerebrale Komplikationen durch Neutralisation von TNF- α verhindert werden (Grau et al., 1987).

IFN- γ (Interferon-gamma) ist ein proinflammatorisches Zytokin und wird durch aktivierte T-Zellen synthetisiert. Bei Malariapatienten ist der Serumspiegel des IFN- γ erhöht (Kwiatkowski et al., 1990). IFN- γ aktiviert Makrophagen und stimuliert indirekt

die B-Zellreifung und B-Zelldifferenzierung. Am Endothel fördert es die Expression von ICAM-1 und begünstigt so die Leukozytenadhäsion, synergistisch mit TNF- α (Cotran & Pober, 1990). Auf neutrophile Granulozyten hat IFN- γ keinen Effekt (Cotran & Pober, 1990). Im Mausmodell scheint IFN- γ bei der Entwicklung cerebraler Komplikationen bei Malaria eine Rolle zu spielen (de Kossodo & Grau, 1993). Eine Korrelation zwischen Serumspiegel und Outcome der Erkrankung von Malariapatienten konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Kern et al., 1989; Jakobsen et al., 1994).

IL-10 (Interleukin 10) ist ein antiinflammatorischer Gegenspieler der oben genannten Zytokine. Th2-Lymphozyten setzen IL-10 frei. Es hemmt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen einschließlich TNF- α , IFN- γ , IL-2 und dem Makrophagen-Kolonie-Stimulierenden-Faktor (M-CSF; Fiorentino et al., 1991). Ferner vermindert IL-10 die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen (Ho & White, 1999). Eine erhöhte Serumkonzentration von IL-10 bei Patienten mit *P. falciparum* konnte in klinischen Studien nachgewiesen werden (Peyron et al., 1994). Ein im Verhältnis zu TNF- α erniedrigter IL-10-Spiegel scheint einen komplizierten Verlauf der Malaria zu begünstigen (Othoro et al., 1999; Ho & White, 1999; May et al., 2000; Perlmann & Troye-Blomberg, 2002).

1.3.3 Die Bedeutung verschiedener Blutzellpopulationen bei Malaria

Im Verlauf der Malaria-Erkrankung sind alle Blutzellpopulationen (Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten) am Erkrankungsgeschehen beteiligt. In einem komplexen Zusammenspiel erfüllen sie unterschiedliche Funktionen und tragen zum Auftreten von Komplikationen bei.

Neutrophile Granulozyten können durch parasitierte Erythrozyten, durch *Plasmodium falciparum*-Merozoiten und durch Parasitenprodukte in vitro (Malhotra et al., 1988) und in vivo (Kharazmi et al., 1987) aktiviert werden. Aktivierte Neutrophile hemmen das Plasmodienwachstum (Kharazmi & Jepsen, 1984), töten Parasiten (Golenser et al., 1992) und phagozytieren infizierte Erythrozyten (Celada et al., 1983a und 1983b). Bei Patienten mit *Malaria tropica* ist der Plasmaspiegel der Humanen Neutrophilen-Elastase (HNE) als Zeichen der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten erhöht. Der erhöhte Plasmaspiegel der HNE korreliert mit einem erhöhten Plasmaspiegel

von Thrombomodulin (TM). TM, ein membranständiger Rezeptor der Endothelzellen, wird vor allem von geschädigten Endothelzellen freigesetzt. Westlin & Gimbrone konnten 1993 durch die Aktivierung von Neutrophilen mit IL-1-haltigem Serum Endothelschaden in vitro induzieren. Auch Hemmer et al. belegten 1994 die Induktion von Endothelschaden durch aktivierte neutrophile Granulozyten in vitro. Die Neutrophilen wurden dabei mit TNF- α -haltigem Serum von Malariapatienten aktiviert. Es ist daher anzunehmen, dass die Neutrophilenaktivierung, vermehrter HNE-Nachweis, im Zusammenhang mit einer Endothelschädigung, vermehrter TM-Nachweis, bei Malaria tropica steht (Hemmer et al., 1994).

In der akuten Phase der Infektion kann eine Mono- und Lymphozytose auftreten (Weatherall et al., 2002). Ex-vivo-Experimente zeigen, dass TNF- α Monozyten und Lymphozyten von Patienten mit Malaria tropica aktiviert (Muniz-Junqueira et al., 2001). Zudem weisen Untersuchungen im Mausmodell und am Menschen darauf hin, dass mononukleäre Zellen und ihre Zytokine zur Elimination von Malariaparasiten und damit zur Begrenzung der Parasitämie entscheidend beitragen (Jason et al., 2001).

Monozyten sezernieren während einer Malariaerkrankung vermehrt IL-6, IL-1 und TNF- α (Grau et al., 1989a; Kern et al., 1989; Pichyangkul et al., 1994; Goldring & Nemaorani, 1999). Außerdem weisen Monozyten während der Infektion mit Plasmodium falciparum eine erhöhte Phagozytoseaktivität auf und exprimieren vermehrt Adhäsionsmoleküle. Dies ermöglicht die Bindung von infizierten Erythrozyten an Monozyten und damit die Elimination des Parasiten (Goldring & Nemaorani, 1999).

Die Exposition von Lymphozyten gegenüber Plasmodienantigenen führt in vitro zur Aktivierung von T-Lymphozyten in Form von T-Zellproliferation und Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (z. B.: IL-4 und IFN- γ ; Perlmann & Troye-Blomberg, 2002). Neben zahlreichen proinflammatorischen Zytokinen können in vivo auch Immunglobuline vermehrt nachgewiesen werden, was auf eine B-Zellaktivierung hinweist. Ein nur geringer Anteil erregerspezifischer Antikörper (Perlmann & Troye-Blomberg, 2002) spricht dafür, dass es sich bei Malaria um eine polyklonale B-Zellaktivierung handelt. Während die T-Lymphozyten vor allem in der Frühphase der

Erkrankung die rasche Abnahme der Parasitämie bewirken, spielen die B-Lymphozyten in der Spätphase bei der vollständigen Elimination der Parasiten eine Rolle (von der Weid et al., 1996; Taylor-Robinson & Phillips 1994 und 1996; Langhorne et al., 1998). Im Mausmodell (Infektion mit *Plasmodium berghei*) konnten durch die Entfernung von CD4- (Grau et al., 1986; Hermesen et al., 1997) und CD8-Zellen (Hermesen et al., 1997; Yanez et al., 1996) cerebrale Komplikationen verhindert werden. Dies bedeutet, dass die T-Zellen nicht nur zur Parasitenabwehr sondern auch zum Entstehen der Komplikationen beitragen.

Mit *Plasmodium falciparum* parasitierte Erythrozyten binden spezifisch am Gefäßendothel. Dies wird als Sequestration oder Zelladhärenz bezeichnet. Sie führt zur Obstruktion von Kapillaren, zur Verminderung des Blutflusses und zur Gewebehypoxie (Miller et al., 2002). Die Sequestration parasitierter Erythrozyten kommt ausschließlich bei *P. falciparum*, nicht jedoch bei den anderen humanpathogenen Plasmodienspezies vor und gilt als wesentlicher Faktor für das Auftreten von letalen Komplikationen der Malaria tropica (MacPherson et al., 1985; Ockenhouse et al., 1992). Parasitierte Erythrozyten können zudem das Gefäßendothel durch Auslösen von Apoptose schädigen (Pino et al., 2003). Auch nichtparasitierte Erythrozyten können bei der schweren Form der Malaria tropica verändert sein und insbesondere durch eine verminderte Elastizität (Miller et al., 2002) die Rheologie verändern und werden bei der Milzpassage zurückgehalten. Sie stehen dem Kreislauf folglich nicht mehr zur Verfügung. Dies trägt zur Entwicklung der Anämie bei Malaria bei.

Im Rahmen der Malaria tropica zeigt ein Großteil der Patienten eine Thrombozytopenie. Ursächlich ist vermutlich eine erhöhte Thrombozytenaktivierung und ein erhöhter Thrombozytenverbrauch (Essien & Ebhota, 1983; Dörmer et al., 1983; Abdalla, 1990). Aktivierte Thrombozyten binden am Endothel und können Lumina verlegen, wie am Mausmodell (*P. berghei*) für Gehirnvenolen gezeigt. Dabei kommt es auch zu Teilfusionen der Thrombozyten mit geschädigten Endothelzellen (Lou et al., 2001). Die Sequestration der Thrombozyten konnte durch Gabe eines monoklonalen Antikörpers (gegen das Leukozyten-funktions-assoziierte Antigen-1, Anti-LFA-1-Mab) blockiert werden, und es kam im Mausmodell zu einer Abnahme der cerebralen Komplikationen (Lou et al., 2001).

Ferner fördert die Thrombozytenaktivierung bei Malaria die Gerinnungsaktivierung (Horstmann et al., 1981; Weatherall et al., 2002). Das Vollbild der Verbrauchs-koagulopathie ist jedoch auch bei schwerer Malaria tropica selten.

1.4 Zelltod: Nekrose und Apoptose

Der Zelltod ist einerseits das irreversible Endstadium einer Zellschädigung als Folge hypoxischer, toxischer, physikalischer, immunologischer oder mikrobieller Einflüsse, andererseits ein physiologischer Vorgang im Rahmen der Embryonalentwicklung und des normalen Gewebeumsatzes.

Man unterscheidet zwei Formen des Zelltodes: Eine passive Form, Nekrose genannt, bei der meist mehrere Zellen oder ein Zellverband betroffen sind, und eine aktive Form, Apoptose genannt, die meist einzelne Zellen betrifft.

1.4.1 Pathophysiologie der Nekrose

Nekrose wird durch äußere Einflüsse (mechanische, physikalische oder chemische Reize) ausgelöst. Sie lässt sich nach dem zeitlichen Verlauf in zwei Stadien untergliedern. Das frühe Stadium der Nekrose ist gekennzeichnet von Zellschwellung, Ausbuchtungen der Zellmembran, Veränderungen am endoplasmatischen Retikulum sowie Schwellung und Vakuolisierung der Mitochondrien. Im weiteren Verlauf kann die Zelle die Kontrolle der Passage von Ionen und/ oder Wasser durch die Plasmamembran nicht mehr aufrechterhalten. Sie schwillt weiter an, bis die Plasmamembran und die intrazellulären Organellenmembranen zerreißen. Der Zellkern schrumpft (Karyopyknose) und wird aufgelöst (Karyolyse), oder er zerfällt in einzelne Bruchstücke (Karyorrhexis), die später aufgelöst werden.

Die bei der Zerstörung der nekrotischen Zelle freigesetzten Bestandteile sind chemotaktisch wirksam und locken Makrophagen und Neutrophile (sog. „professional phagocytes“) an. Dadurch kommt es in der Umgebung der nekrotischen Zelle zur ausgeprägten Entzündungsreaktion.

1.4.2 Pathophysiologie der Apoptose

Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver Prozess der Zelle, man spricht daher vom „programmierten Zelltod“. Apoptose tritt physiologischerweise bei Involutionsprozessen auf, z. B. im Rahmen der Embryonalentwicklung. Pathologische Apoptose wird bei Viruserkrankungen (Tod infizierter Wirtszellen), bei Autoimmunerkrankungen und degenerativen Erkrankungen, bei ischämischer Gewebsschädigung und bei der Krebsentstehung beobachtet.

Apoptose kann durch hormonähnliche Faktoren oder Zytokine, wie Fas-Ligand oder TNF- α , die an ihre korrespondierenden Rezeptoren an der Zellmembran binden, induziert werden. Weitere mögliche Auslöser sind Hypoxie, Radikale, Toxine, Chemotherapeutika und Strahlung sowie das Fehlen notwendiger Wachstumsfaktoren.

Morphologisch verliert die apoptotische Zelle zunächst interzelluläre Zellverbindungen und löst sich damit aus dem Zellverband. Gleichzeitig schrumpft sie, die Zellorganellen sind jedoch im Gegensatz zur Nekrose noch intakt.

Gleichzeitig werden Caspasen (Nukleasen und Proteasen), die zunächst als Proenzyme in der Zelle vorhanden sind, proteolytisch aktiviert. Diese Caspasen spalten Strukturproteine der Zelle sowie die DNA an charakteristischen Stellen. Dies geht mit einer Umstrukturierung des Zytoskeletts und der Zelloberfläche einher.

Phosphatidylserin-Reste werden von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran verlagert. Ferner kommt es zur Bildung membrangebundener Vesikel, welche Zytoplasmarestes, Nukleusfragmente und noch intakte Mitochondrien enthalten. Die Vesikel schnüren sich im weiteren Verlauf als sogenannte „apoptotic bodies“ ab.

Apoptotische Zellen werden von Makrophagen phagozytiert. Dabei kommt es im Gegensatz zur Nekrose zu keiner entzündlichen Umgebungsreaktion. Apoptotische Zellen, die der Phagozytose entgehen, werden sekundär nekrotisch.

1.5 Fragestellung

Die Malaria tropica ist die schwerste Form einer Malariaerkrankung. Sie kann mit einer Vielzahl an Komplikationen einhergehen, oft verläuft sie letal. Als wichtige Ursache für das Auftreten von Komplikationen wird eine Schädigung des Endothels angesehen (Horstmann et al., 1981 und 1985; MacPherson et al., 1985; Oo et al., 1987).

In dieser Arbeit soll zunächst die Endothelschädigung bei M. tropica in einem in-vitro-Modell dargestellt werden. Als erste Annäherung an den Mechanismus der Schädigung soll geklärt werden, ob dabei apoptotischer Zelltod vorliegt.

In der Literatur ist für verschiedene Zellen eine Beteiligung an immunologischen Prozessen im Rahmen der Malaria belegt. Daher soll als nächstes untersucht werden, welche Blutzellpopulationen zur Schädigung des Endothels beitragen. Dazu müssen die Populationen separat untersucht werden. Es soll der Einfluss neutrophiler Granulozyten, mononukleärer Zellen (Monozyten und Lymphozyten), nichtparasitierter Erythrozyten und Thrombozyten betrachtet werden.

Werden Zelltypen identifiziert, die einen Einfluss auf die Schädigung des Endothels haben, sollte zum einen untersucht werden, ob dies durch einen direkten Kontakt mit dem Endothel oder durch das Freisetzen von Mediatoren erfolgt. Zum anderen ist interessant, ob dieser Prozess durch Medikamente beeinflussbar ist. Dazu werden Substanzen eingesetzt, die die Funktion der einzelnen Blutzellpopulationen hemmen oder Sekretionsprodukte der Blutzellen neutralisieren, nämlich die Antioxidantien Ascorbinsäure (Vitamin C) und Tocopherol (Vitamin E), die Protease-Inhibitoren Ulinastatin und Gabexat-Mesilat sowie das Methyl-Xanthin-Derivat Pentoxifyllin (Phosphodiesterase-Hemmer).

In der Literatur ist weiterhin belegt, dass bei Patienten mit M. tropica der Serumspiegel von TNF- α erhöht ist, wobei die Höhe des Spiegels mit dem Schweregrad der Malaria korreliert. Dabei scheint TNF- α pathophysiologisch eine wesentliche Rolle auch beim Auftreten von Endothelschaden zu haben. Mit Hilfe von

Anti-TNF- α -Antikörpern soll der Einfluss von TNF- α auf die Schädigung des Endothels untersucht werden.

2 Material, Methoden und Patienten

Als Modell zur Untersuchung eines möglichen Endothelschadens bei Malaria wurden kultivierte menschliche Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells - HUVEC) verwendet. Diese wurden mit Seren von Patienten mit Malaria tropica (tödlicher Verlauf, komplizierter, nicht tödlicher Verlauf und unkomplizierter Verlauf) beziehungsweise Seren von gesunden Kontrollpersonen inkubiert, in Anwesenheit oder Abwesenheit von isolierten Blutzellen (neutrophile Granulozyten, mononukleäre Zellen, Thrombozyten und Erythrozyten; s. Anhang).

2.1 Patienten

Zwei der Patienten, deren Seren verwendet wurden, waren an tödlich verlaufender Malaria tropica erkrankt, fünf an kompliziert verlaufender, nicht tödlicher Malaria tropica und fünf Patienten an unkompliziert verlaufender, milder Malaria tropica. Alle Patienten waren nichtimmune Europäer, die nach einer Afrikareise an Malaria erkrankt waren. Als Kontrollseren wurden Serumproben von zwei gesunden, freiwilligen Europäern verwendet.

2.2 Gewinnung der Seren von Patienten und Probanden

Malariapatienten und gesunden Kontrollpersonen wurden 10 ml Vollblut aus der Antekubitalvene in Serum-Monovetten (Gerinnungsaktivator: kaolinbeschichtete Polystyrolkugeln, Fa. Sarstedt) abgenommen. Das Vollblut wurde für 10 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Das separierte Serum wurde vorsichtig abpipettiert, in 2-ml-Röhrchen (Fa. Nunc) portioniert und bei –80 °C tief gefroren.

Für die Experimente wurde die jeweils benötigte Menge Serum aufgetaut und das Serum im Verhältnis 1:10 mit Sparmedium verdünnt.

2.3 Endothelzellkultur (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)

Endothelzellen wurden aus der Vene einer menschlichen Nabelschnur, spätestens 6 Stunden nach der Entbindung, isoliert. Die Vene wurde mit calciumfreiem HEPES-Puffer gespült und dann mit Kollagenaselösung gefüllt. Anschließend wurde die Nabelschnur 13 Minuten lang bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert, sodann wurde die Nabelschnur vorsichtig manuell geknetet, um das Ablösen der Endothelzellen von der Venenwand zu fördern. Der Inhalt der Vene wurde im Vollmedium aufgefangen. Mittels des fötalen Kälberserums (FKS) im Medium wurde die Kollagenase neutralisiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei 160 g für 10 Minuten zentrifugiert und das sich absetzende Sediment aus Endothelzellen wieder in frisches Vollmedium aufgenommen und in gelatinebeschichtete Kulturgefäße überführt.

Die Endothelzellen (HUVEC) wurden bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Luft mit 5 % CO₂ kultiviert und alle zwei Tage mit calciumhaltigem HEPES-Puffer gewaschen und mit frischem Medium versorgt. Sobald die Endothelzellen konfluent gewachsen waren, wurden sie mit calciumfreiem HEPES-Puffer gespült, anschließend mit Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) von der Kulturplatte gelöst, in neuem Vollmedium aufgenommen und in einer Verdünnung von 1:3 neu ausgesät.

Für die Experimente wurden Zellen der zweiten oder dritten Passage von mindestens zwei verschiedenen Nabelschnüren gepoolt und in den inneren 60 Vertiefungen (circa 10.000 Endothelzellen pro Vertiefung) einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Die Experimente wurden durchgeführt, sobald die Zellen in den einzelnen Vertiefungen nahezu konfluent gewachsen waren.

2.4 Isolierung einzelner Blutzellpopulationen

Vor jedem Experiment wurden zur Isolierung der einzelnen Blutzellpopulationen 40 ml EDTA-Blut von gesunden Freiwilligen bei minimaler Stauung abgenommen und entweder sofort bei 4 °C zentrifugiert oder auf Eis (maximal 30 Minuten) aufbewahrt.

Die Isolierung der Zellpopulationen erfolgte bei Kühlung auf Eis, um eine Aktivierung der Blutzellen zu vermeiden.

2.4.1 Isolierung neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden mittels Percoll-Dichte-Gradientenzentrifugation (Dooley et al., 1982) über einen 3-stufigen Gradienten isoliert. Hierzu wurde zunächst das EDTA-Blut 10 Minuten lang bei 4 °C und 500 g zentrifugiert. Der entstehende Buffy Coat (BC, Leukozytenschicht zwischen Plasma und Erythrozyten) wurde vorsichtig abpipettiert und auf Eis weiterverarbeitet. Ein 3-stufiger Dichtegradient aus Percoll-Lösung (pH 7,4), isotonisiert mit 10-fach konzentrierter Phosphate Buffered Saline-Lösung (PBS), wurde vorbereitet, und jeweils 2 ml Percoll jeder Dichte (1,098 g/ml unten, 1,090 g/ml mittig und 1,081 g/ml oben) wurden vorsichtig in einem sterilen Glasröhrchen übereinander geschichtet.

Dieser 3-stufige Gradient wurde vorsichtig mit dem BC überschichtet und das Glasröhrchen bei 4 °C und 500 g für 30 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Dabei reicherten sich die neutrophilen Granulozyten an der Grenzschicht zwischen 1,098 g/ml und 1,090 g/ml an und konnten entnommen werden. Nach dreimaligem Waschen der Granulozyten mit isotonem PBS-Puffer wurden Zellzahl und Reinheit mit Hilfe des Abbott Cell Counters bestimmt und mit PBS eine Konzentration von zehn Gigapartikel pro Liter (10.000 Leukozyten pro μ l) eingestellt.

2.4.2 Isolierung mononukleärer Zellen

Mononukleäre Zellen wurden mittels Ficoll-Dichtezentrifugation (Histopaque®; Böyum, 1968) isoliert. Zuerst wurde zum Buffy Coat (s. 2.4.1) das gleiche Volumen 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (NaCl) gegeben und das Zellgemisch anschließend mit Hypaque-Lösung (Dichte 1.060 g/ml) unterschichtet. Durch diesen Schritt wurden die Thrombozyten abgetrennt, deren Dichte unter 1,060 g/ml liegt (Pertoft et al., 1979; Methode nach Casale & Kaliner, 1982). Der Ansatz (aus Dichtegradient und Zellgemisch) wurde bei 22 °C und 400 g für 5 Minuten zentrifugiert, der entstandene Überstand wurde verworfen. Das verbliebene Zellgemisch wurde vorsichtig auf den Ficoll-Gradienten (Dichte 1.077 ± 0.001 g/ml) geschichtet und bei 22 °C und 1000 g für 15 Minuten ohne Bremse erneut zentrifugiert (de Pauw et al., 1979). Die mononukleären Zellen sammelten sich oberhalb der Erythrozyten, erkennbar als

milchig-weißer Ring. Dieser wurde vorsichtig abpipettiert und die mononukleären Zellen mehrmals mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen (Casale & Kaliner, 1982). Abschließend wurde die Zellzahl mittels Abbott Cell Counter ermittelt und das Gemisch mit PBS auf eine Endkonzentration von zehn Gigapartikel pro Liter eingestellt.

2.4.3 Isolierung der Erythrozyten

Die Erythrozyten wurden aus den Erythrozytenunterständen, die sich bei der Neutrophilenseparation mittels Stufengradient (s. 2.4.1) als breites rotes Pellet absetzten, entnommen. Dieses Pellet wurde vorsichtig aufgenommen und drei mal mit PBS gewaschen. Mittels Abbott Cell Counter wurde die Konzentration bestimmt. Die Endkonzentration von 1000 Gigapartikel pro Liter (1 Million Erythrozyten pro μl) wurde mit PBS eingestellt.

2.4.4 Isolierung von Thrombozyten

Frisch entnommenes EDTA-Blut wurde 10 Minuten lang bei 4 °C und 500 g zentrifugiert (s. 2.4.1). Der Überstand wurde als thrombozytenreiches Plasma weiterverwendet. Die Thrombozyten wurden mit Hilfe von isotonem PBS in einem zweiten Zentrifugationsschritt gereinigt. Abschließend wurde die Zellzahl mit dem Abbott Cell Counter bestimmt. Für die Experimente wurde die Endkonzentration mit PBS auf 1000 Gigapartikel pro Liter (1 Million Thrombozyten pro μl) eingestellt.

2.5 Experimente

Die Experimente wurden im Doppelansatz durchgeführt. Dazu wurden die inneren 60 Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit Endothelzellen besät (s. 2.3). Sobald die Endothelzellen nahezu konfluent gewachsen waren, wurden die Vertiefungen zunächst nur mit 20 μl Serum eines Patienten mit Malaria oder, zur Kontrolle, mit Serum eines gesunden Probanden inkubiert, um zu prüfen, ob Serum von Malaria-patienten (Gefäß-) Endothel in vitro schädigen kann. In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss einzelner Blutzellen auf die Endothelschädigung bei Malaria untersucht. In jede Vertiefung mit Endothelzellen und Serum wurden 20 μl eines Blutzellisolates (Neutrophile, mononukleäre Zellen, Erythrozyten oder Thrombozyten) hinzugefügt.

Ob der direkte Kontakt zwischen Endothelzellen und Neutrophilen für eine Schädigung des Endothels notwendig ist, wurde mittels einer porösen Membran (transwell inserts, Siebeinsatz), die die Neutrophilen während der Inkubation mit Endothelzellen und Serum vom Endothel abtrennt, untersucht.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob der Einfluss der isolierten Blutzellen gehemmt werden kann. Dazu wurde zusätzlich zu den Endothelzellen, dem Serum und den isolierten Blutzellen ein Hemmstoff (Ascorbinsäure, Tocopherol, Ulinastatin, Pentoxifyllin oder Gabexat-Mesilat) zugesetzt. Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen wurden so gewählt, dass die bei klinischer Applikation am Menschen erreichbaren Plasmakonzentrationen berücksichtigt wurden.

Um eine mögliche Rolle von TNF- α bei der Entstehung von Endothelschaden zu untersuchen, wurden bei Experimenten mit Neutrophilen Anti-TNF- α -Antikörper (1 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt, wo angegeben.

Abschließend wurde jede Vertiefung mit „Sparmedium“ auf ein Gesamtvolumen von 200 μl aufgefüllt. Durch das Auffüllen wurde das Serum 1:10 verdünnt. Die so befüllten Mikrotiterplatten wurden bei 37 °C im CO₂-Brutschrank 70 Minuten inkubiert und anschließend zwei mal mit HEPES-Puffer gespült. Es folgte eine weitere Inkubation der Endothelzellen mit 200 μl Vollmedium für 4½ Stunden.

Nach diesen Inkubationsschritten wurden die Zellen für 10 bis 15 Minuten mit einem eiskalten Gemisch aus Methanol und Aceton (50:50 V/V) fixiert und anschließend luftgetrocknet. Schließlich wurden apoptotische Endothelzellen nach Fixierung mittels TUNEL-Färbung (2.6.1) detektiert.

2.6 Färbung der Endothelzellen zum Nachweis von Apoptose mittels TUNEL-Reagenz

Für den Nachweis apoptotischer Endothelzellen wurden diese mit dem „In Situ Cell Death Detection Kit“ (Roche Diagnostics) gefärbt. Dabei werden apoptotische Zellkerne durch enzymatische in-situ-Markierung ihrer DNA-Strangbrüche gekenn-

zeichnet. Mittels der terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) wird Fluorescein-Isocyanat-konjugiertes Uridintriphosphat (FITC-konjugiertes UTP) als fluoresceinmarkiertes Nukleotid in die partiell degradierte DNA eingeführt. Dabei bindet FITC-konjugiertes UTP an den apoptosespezifischen 3'-OH-Enden der Doppelstrangbrüche (nick ends; Terminal (Desoxyribosyl-Transferasemediated) UTP Nick End Labeling, TUNEL).

Zellkulturen, die für die TUNEL-Färbung vorgesehen waren, wurden nach der letzten Inkubation mit calciumhaltigem HEPES-Puffer gespült und, wie bereits beschrieben, mit einem eiskalten Methanol-Aceton-Gemisch in den Vertiefungen fixiert. Für die Färbung wurden die fixierten Endothelzellen mit kalter PBS-Pufferlösung gespült und für 5 Minuten mit kalter Permeabilisierungslösung versetzt, um die Membranen der Zellen und Zellkerne zu permeabilisieren. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS-Puffer, im Wechsel mit und ohne BSA-Lösung versetzt, gespült. Dann wurden in jede Vertiefung 50 μ l Färbelösung (TUNEL-Reagenz: Enzyme Solution TdT und Label Solution FITC-UTP im Verhältnis 1:10) gegeben. Nachfolgend wurde die Mikrotiterplatte lichtgeschützt für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde die Platte alle 5 bis 10 Minuten leicht geschwenkt. Anschließend wurden die Vertiefungen erneut mit PBS-Puffer, im Wechsel mit und ohne BSA-Lösung versetzt, gespült. Um die Fluoreszenzmarkierung der apoptotischen Endothelzellkerne zu stabilisieren, wurden weiterhin in jede Vertiefung 100 μ l 0,6%iges 1,4-Diazabicyclo(2,2,2)Oktan (DABCO), in einem PBS/Glycerin-Gemisch gelöst (im Verhältnis 1:1), gegeben. Die Platte wurde abschließend unter einem inversen Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die apoptotischen Endothelzellkerne waren durch das FITC-UTP als grün leuchtende Kerne sichtbar, da Fluorescein mit UV-Licht der Wellenlänge von 490 nm angeregt wird und grünes Licht der Wellenlänge 518 nm abgibt. Das Ergebnis wurde als Anteil der fluoreszierenden Zellkerne an jeweils 100 gezählten Zellkernen angegeben.

2.7 Auswertung und Darstellung

Alle Experimente wurden im Doppelansatz durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 100 zufällig ausgewählte Zellen ausgezählt und der Anteil der apoptotischen Zellen

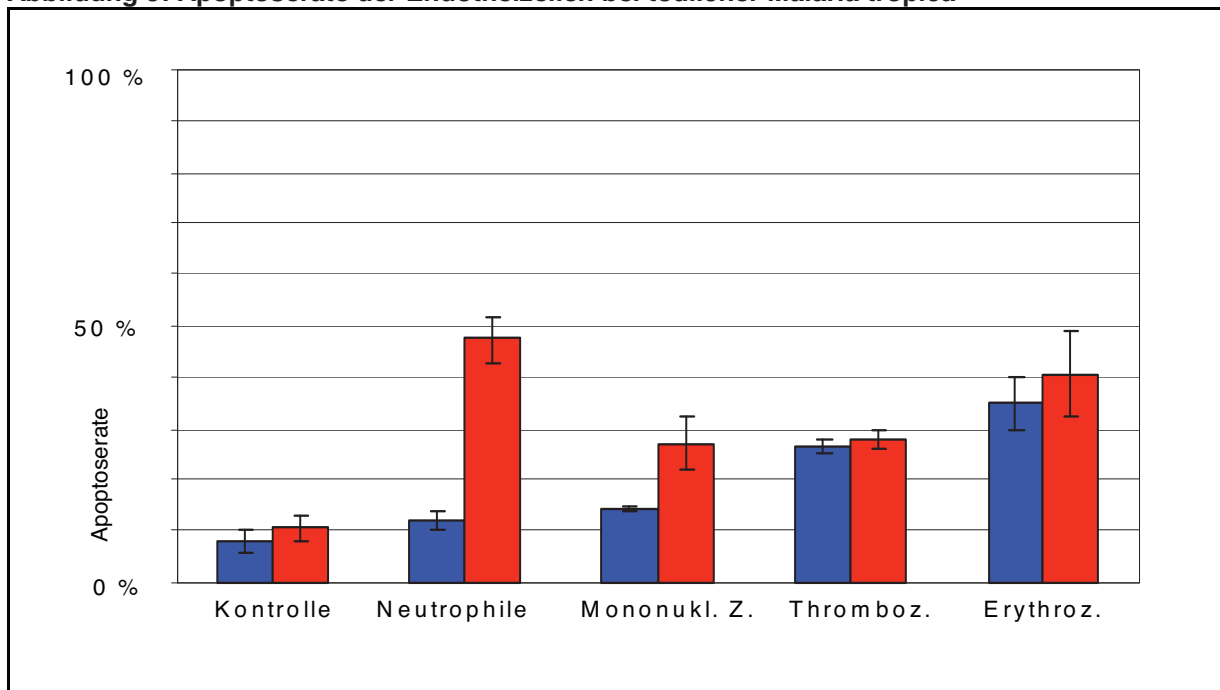
ermittelt. Während der Zählung wurden mindestens fünf verschiedene Gesichtsfelder eingestellt. Das Ergebnis eines Versuchs wird als gerundeter Mittelwert des Doppelansatzes in Prozent angegeben. Wurden innerhalb eines Ansatzes Serien verschiedener Patienten bzw. Probanden verwendet, wird der Median der gerundeten Mittelwerte des Doppelansatzes angegeben. In den Grafiken erfolgt die Darstellung mit Variationsbreite.

3 Ergebnisse

3.1 Inkubation von Endothelzellkulturen aus menschlichen Nabelschnurvenen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells - HUVEC) mit Patienten- oder Kontrollserum in Anwesenheit oder Abwesenheit verschiedener Blutzellpopulationen

3.1.1 Malaria tropica mit tödlichem Verlauf

Abbildung 5: Apoptoserate der Endothelzellen bei tödlicher Malaria tropica



Blau: Kontrollserum (gesunder Proband), rot: Patientenserum (tödliche Malaria).

In Abwesenheit von Blutzellen führte die Inkubation von Endothelzellen mit Patientenserum zu einer geringfügig höheren Apoptoserate als die Inkubation mit Serum von gesunden Kontrollpersonen (11 % vs. 8 %).

In Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten führte die Inkubation von Endothelzellen mit Patientenserum zu einer deutlich höheren Apoptoserate als die Inkubation mit Serum von gesunden Kontrollpersonen (48 % vs. 12 %).

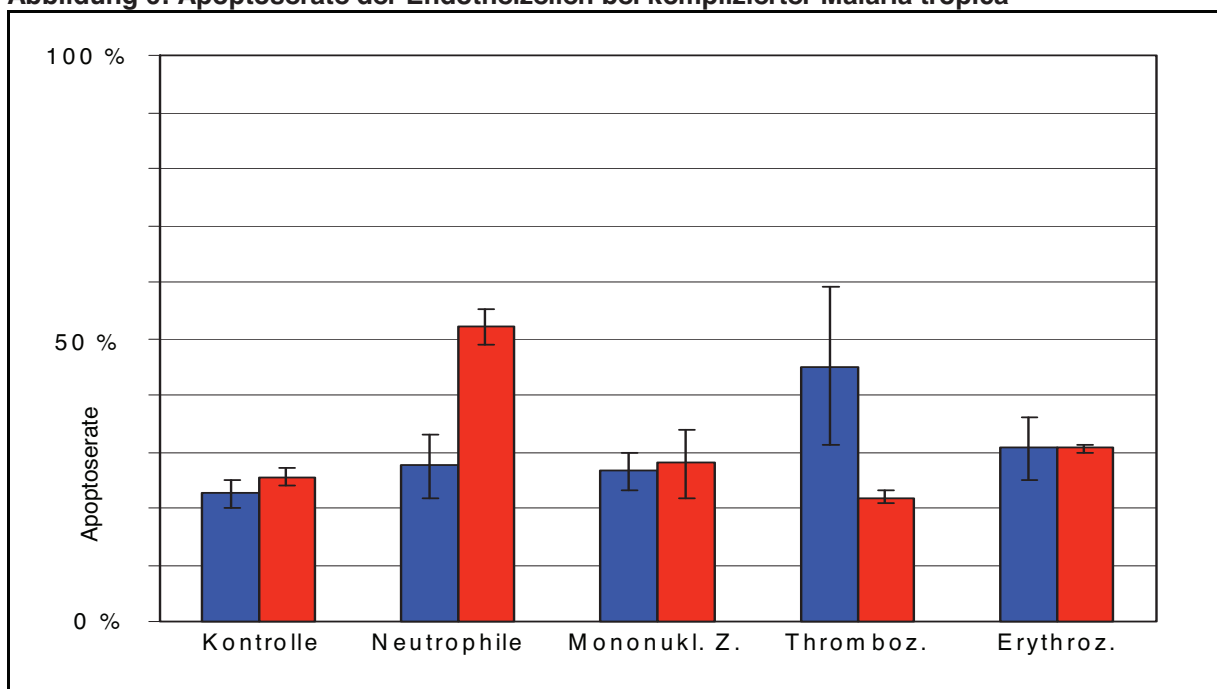
In Anwesenheit von mononukleären Zellen führte die Inkubation von Endothelzellen mit Patientenserum zu einer geringgradig höheren Apoptoserate als die Inkubation mit Serum von gesunden Kontrollpersonen (27 % vs. 15 %).

In Anwesenheit von Thrombozyten führte die Inkubation von Endothelzellen mit Patientenserum nicht zu einer höheren Apoptoserate als die Inkubation mit Serum von gesunden Kontrollpersonen (28 % vs. 27 %).

In Anwesenheit von Erythrozyten führte die Inkubation von Endothelzellen mit Patientenserum zu einer geringgradig höheren Apoptoserate als die Inkubation mit Serum von gesunden Kontrollpersonen (41 % vs. 35 %).

3.1.2 Malaria tropica mit nicht tödlichem, kompliziertem Verlauf

Abbildung 6: Apoptoserate der Endothelzellen bei komplizierter Malaria tropica



Blau: Kontrollserum (gesunder Proband), rot: Patientenserum (komplizierte Malaria).

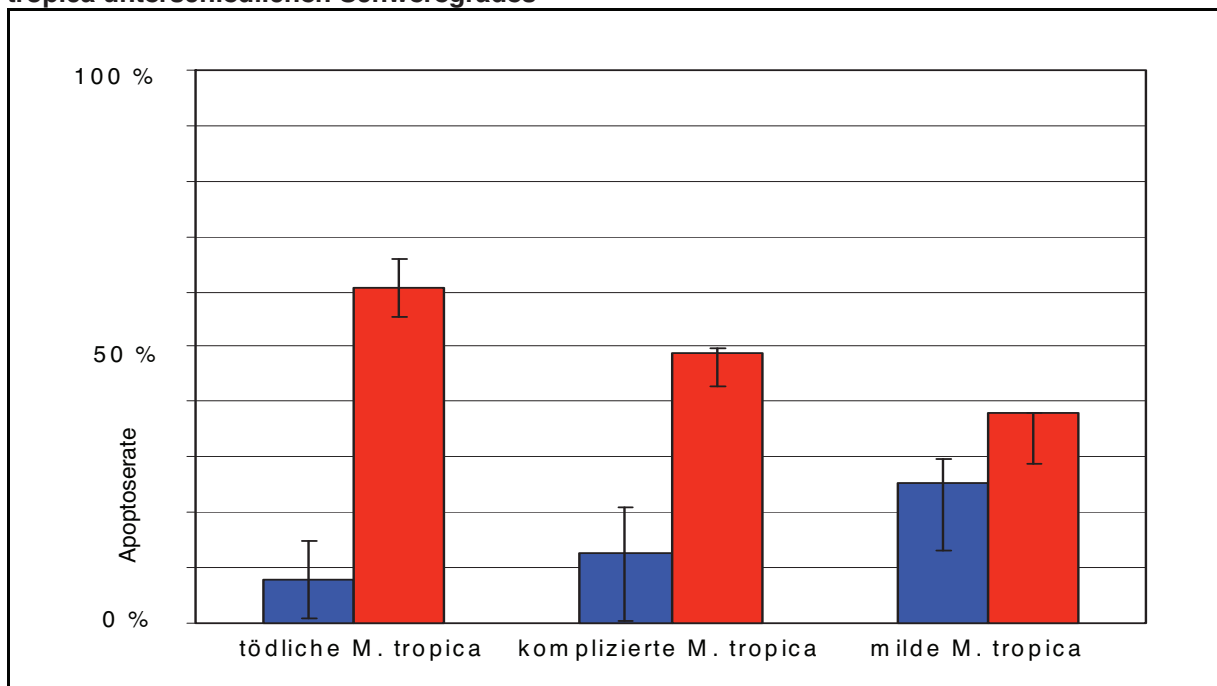
In Abwesenheit von Blutzellen führte die Inkubation von Endothelzellen mit Patientenserum zu einer ähnlich hohen Apoptoserate wie die Inkubation mit Serum von gesunden Kontrollpersonen (26 % vs. 23 %).

In Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten führte die Inkubation von Endothelzellen mit Patientenserum zu einer deutlich höheren Apoptoserate als die Inkubation mit Serum von gesunden Kontrollpersonen (52 % vs. 28 %).

In Anwesenheit von mononukleären Zellen, Erythrozyten oder Thrombozyten führte die Inkubation von Endothelzellen mit Serum eines Patienten nicht zu einer Erhöhung der Apoptoserate gegenüber der Inkubation mit Kontrollserum (mononukleäre Zellen: 28 % vs. 27 %; Erythrozyten: 31 % vs. 31 %; Thrombozyten: 22 % vs. 45 %).

3.2 Inkubation von HUVEC mit Patientenserum und Neutrophilen

Abbildung 7: Einfluss von Neutrophilen auf die Apoptoserate von Endothelzellen bei Malaria tropica unterschiedlichen Schweregrades



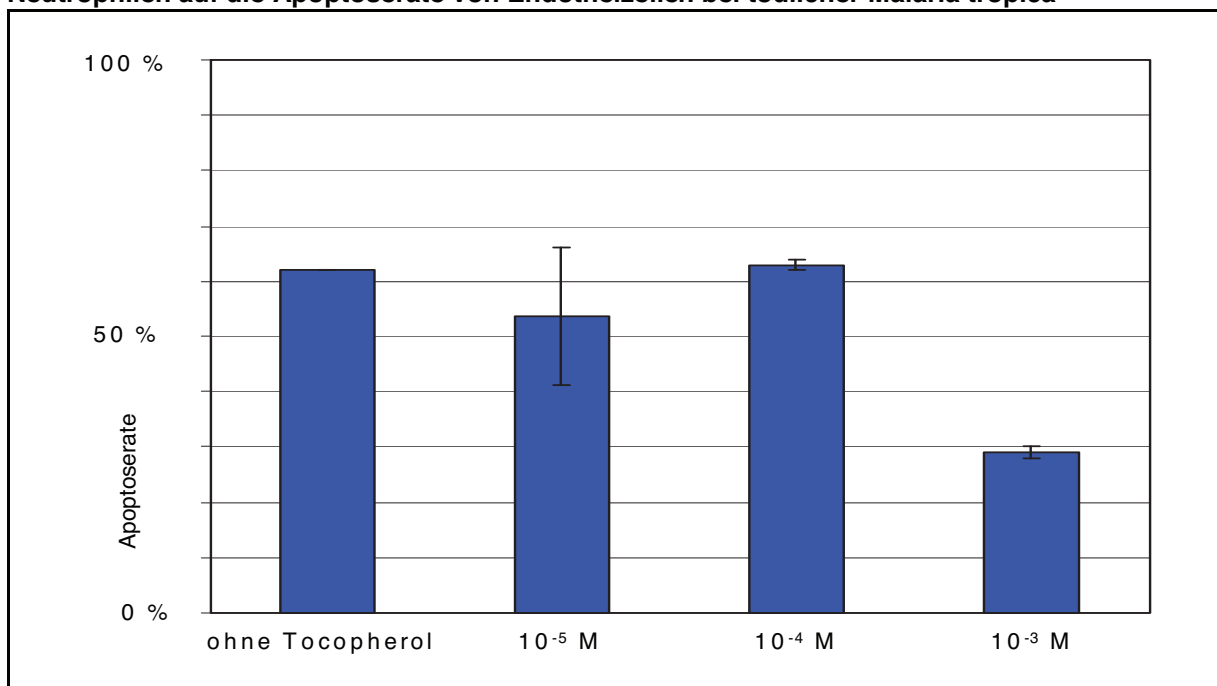
Blau: Kontrollserum, rot: Patientenserum.

Die Inkubation von HUVEC mit Serumproben von Malariapatienten führte in Anwesenheit von Neutrophilen zu einer höheren Apoptoserate der Endothelzellen als die Inkubation mit Serum von gesunden Kontrollpersonen (tödliche Malaria: 61 % vs. 8 %, n = 2; komplizierte Malaria: 49 % vs. 13 %, n = 5; nicht komplizierte, milde Malaria: 38 % vs. 26 %, n=5).

3.3 Inkubation von HUVEC und Neutrophilen mit dem Serum eines Patienten mit tödlicher Malaria tropica: Wirkung von Tocopherol, Ascorbinsäure, Ulinastatin, Gabexat-Mesilat und Pentoxifyllin

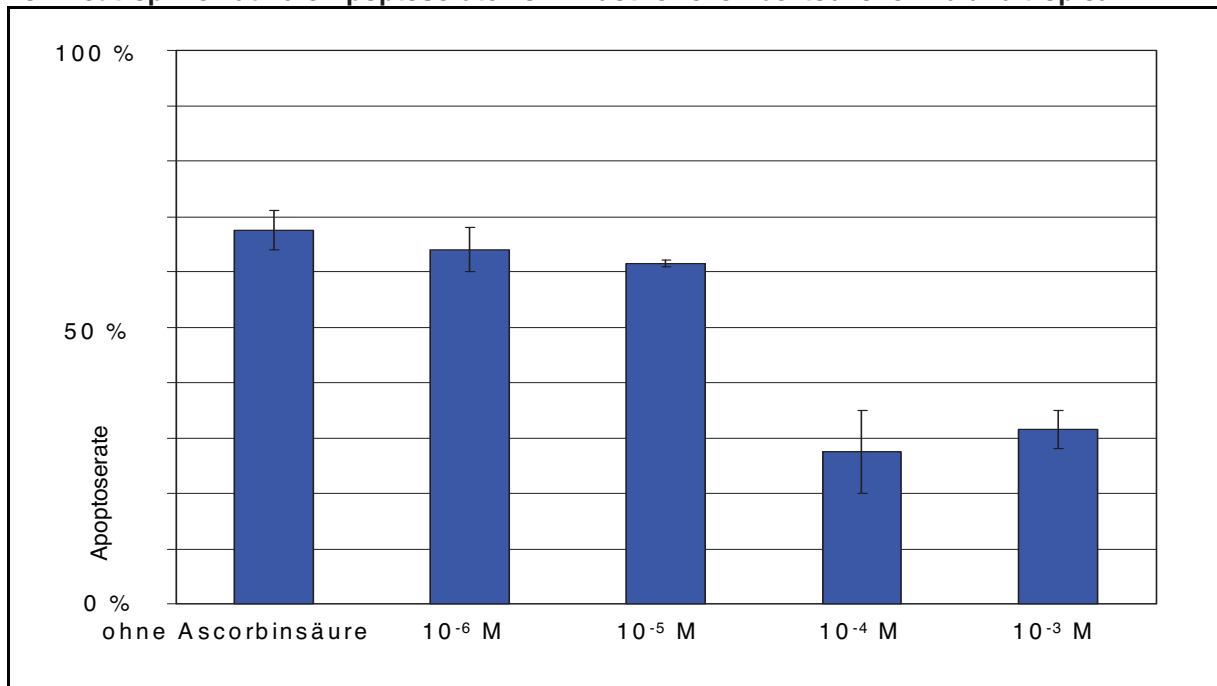
Ein Ansatz mit HUVEC, Patientenserum, Neutrophilen und Hemmstoff wurde mit einem Ansatz ohne Hemmstoff verglichen.

Abbildung 8: Einfluss von Tocopherol in verschiedenen Konzentrationen auf die Wirkung von Neutrophilen auf die Apoptoserate von Endothelzellen bei tödlicher Malaria tropica



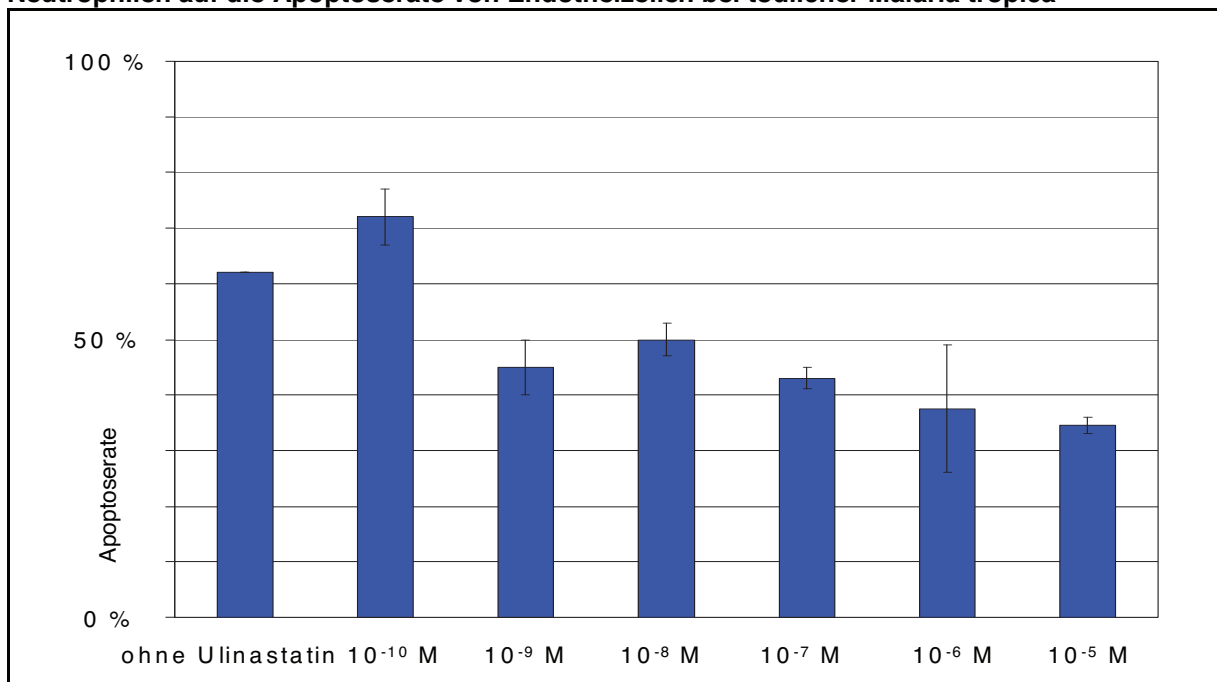
Tocopherol führte in einer Konzentration von 10^{-3} mol/l zum Absinken der Apoptoserate (29 %) gegenüber Patientenserum ohne Tocopherol (29 % vs. 62 %). In niedrigeren Konzentrationen zeigte Tocopherol keinen eindeutigen Effekt (10^{-4} mol/l: 63 %, 10^{-5} mol/l : 54 %; s. Abb. 8).

Abbildung 9: Einfluss von Ascorbinsäure in verschiedenen Konzentrationen auf die Wirkung von Neutrophilen auf die Apoptoserate von Endothelzellen bei tödlicher *Malaria tropica*



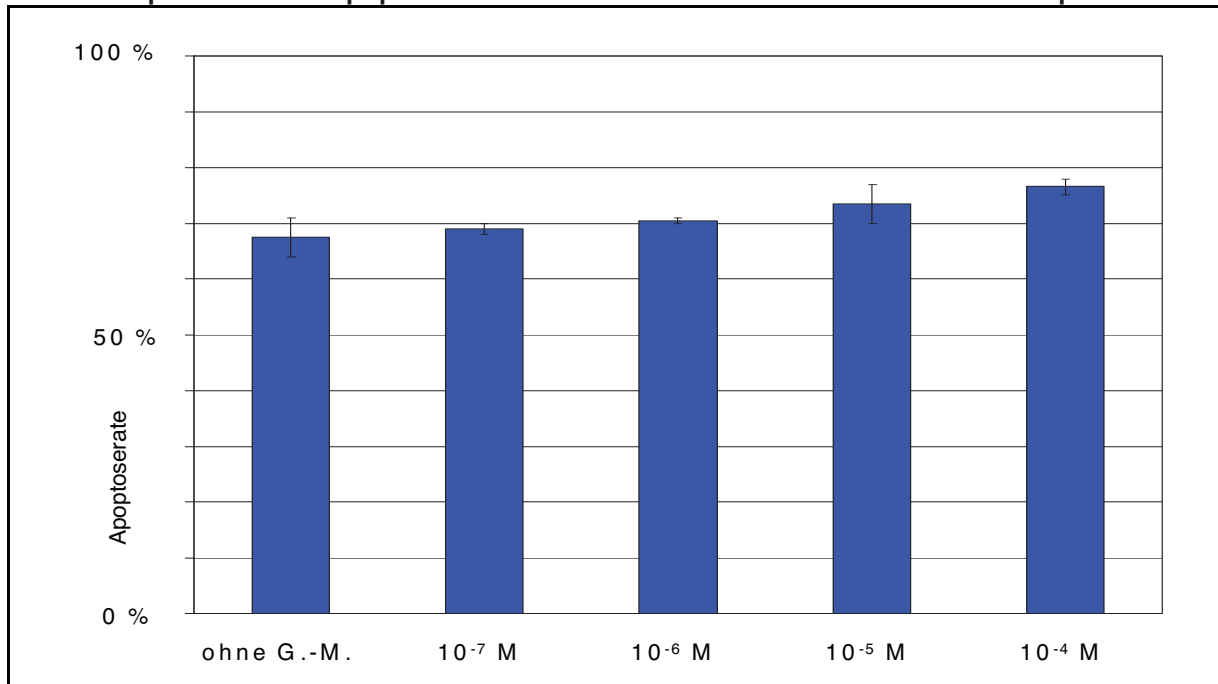
Ascorbinsäure zeigte einen hemmenden Effekt auf die Apoptoserate der Endothelzellen ab einer Konzentration von 10^{-4} mol/l (10^{-4} mol/l: 28 %, 10^{-3} mol/l: 32 %, Kontrolle ohne Ascorbinsäure: 68 %). Für niedrigere Konzentrationen wurde kein Effekt beobachtet (10^{-6} mol/l: 64 %, 10^{-5} mol/l: 62 %, Kontrolle: 68 %; s. Abb. 9).

Abbildung 10: Einfluss von Ulinastatin in verschiedenen Konzentrationen auf die Wirkung von Neutrophilen auf die Apoptoserate von Endothelzellen bei tödlicher *Malaria tropica*



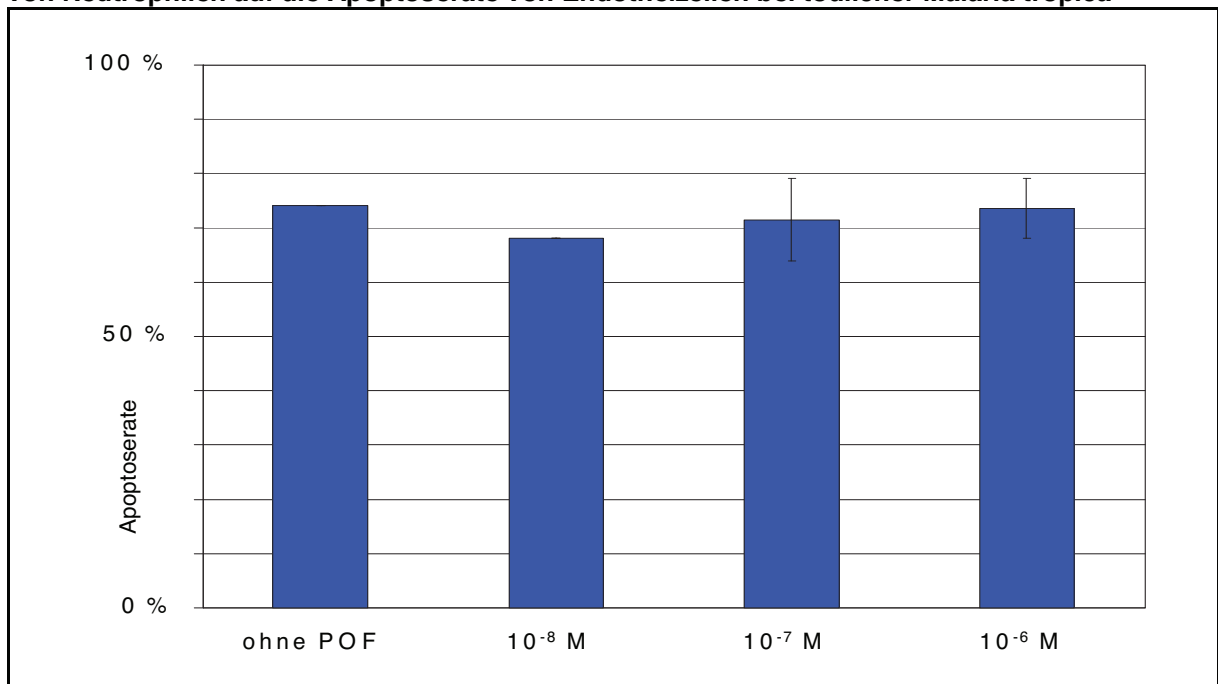
Auch die Applikation von Ulinastatin zeigte einen dosisabhängigen hemmenden Effekt auf die Apoptoserate (10^{-10} mol/l: 72 %, 10^{-9} mol/l: 45 %, 10^{-8} mol/l: 50 %, 10^{-7} mol/l: 43 %, 10^{-6} mol/l: 38 %, 10^{-5} mol/l: 35 %, Kontrolle: 62 %; s. Abb. 10) .

Abbildung 11: Einfluss von Gabexat-Mesilat in verschiedenen Konzentrationen auf die Wirkung von Neutrophilen auf die Apoptoserate von Endothelzellen bei tödlicher Malaria tropica



G.-M.: Gabexat-Mesilat.

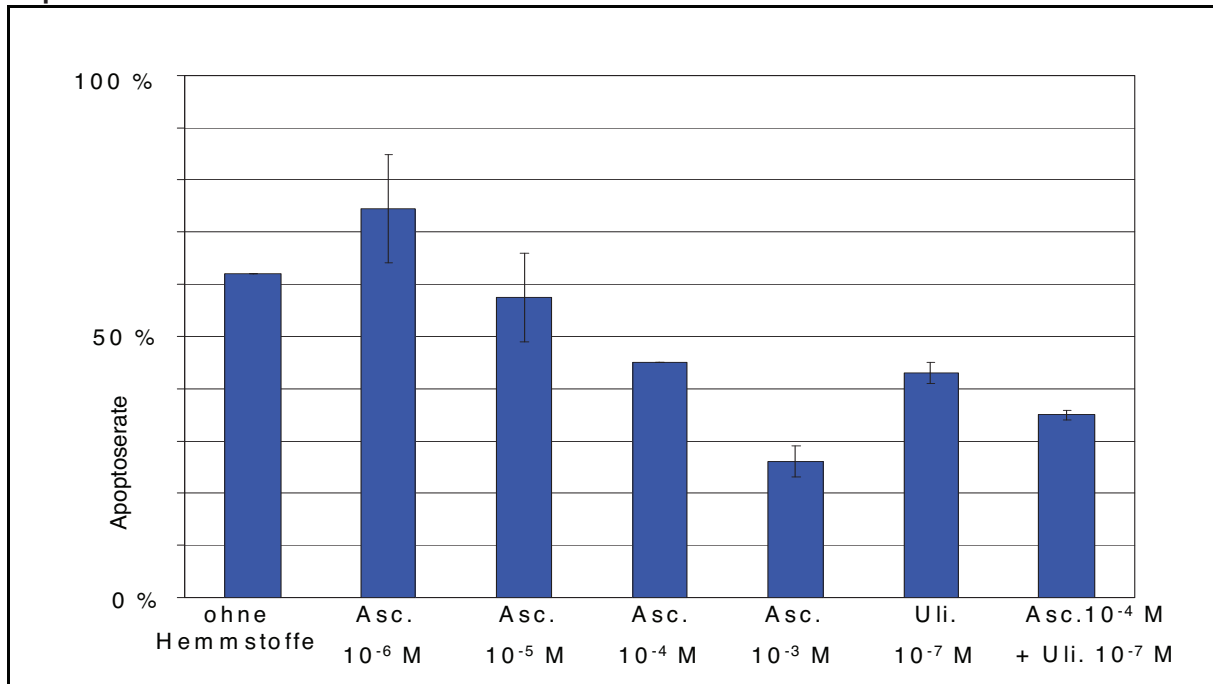
Abbildung 12: Einfluss von Pentoxifyllin in verschiedenen Konzentrationen auf die Wirkung von Neutrophilen auf die Apoptoserate von Endothelzellen bei tödlicher Malaria tropica



POF: Pentoxifyllin.

Die Applikation von Gabexat-Mesilat (10^{-4} mol/l: 77 %, 10^{-5} mol/l: 74 %, 10^{-6} mol/l: 71 %, 10^{-7} mol/l: 69 %, Kontrolle: 68 %) oder Pentoxifyllin (10^{-6} mol/l: 74 %, 10^{-7} mol/l: 72 %, 10^{-8} mol/l: 68 %, Kontrolle: 74 %) zeigte keinen Effekt auf die Apoptoserate (s. Abb. 11 und Abb. 12).

Abbildung 13: Einfluss von Ulinastatin und Ascorbinsäure und deren Kombination auf die Wirkung von Neutrophilen auf die Apoptoserate von Endothelzellen bei tödlicher Malaria tropica



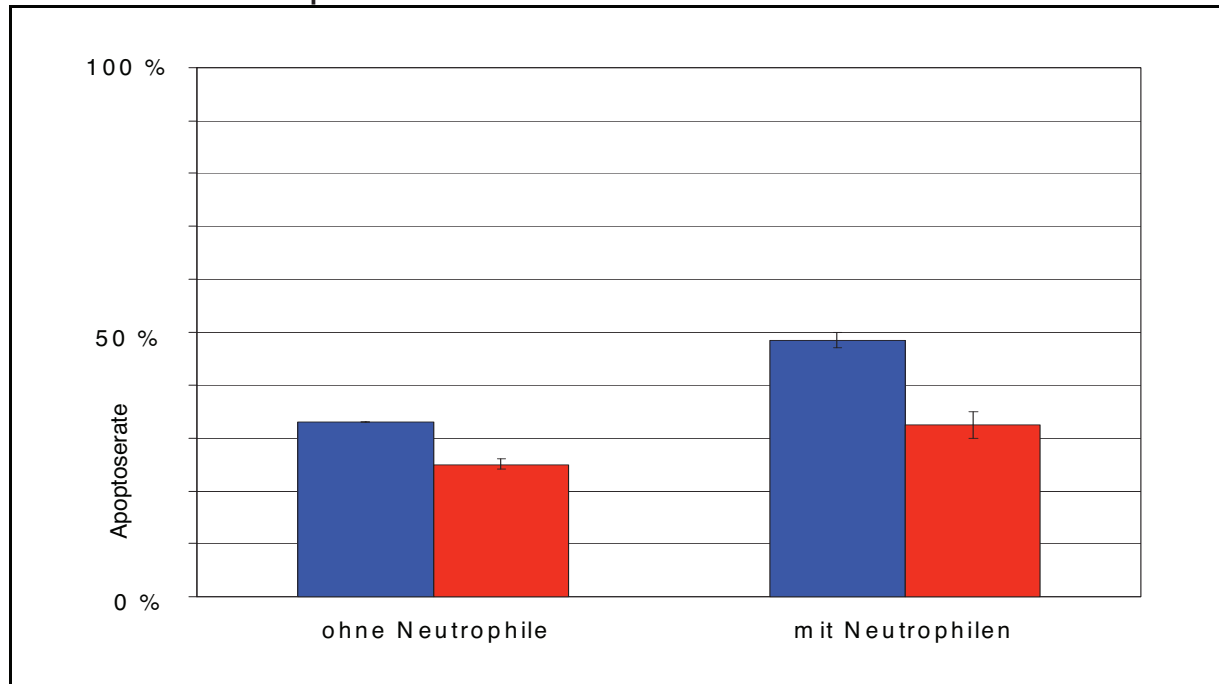
Asc.: Ascorbinsäure, Uli.: Ulinastatin.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die Kombination der Hemmstoffe Ascorbinsäure und Ulinastatin den hemmenden Effekt noch verstärkt.

Die Kombination von Ulinastatin 10^{-7} mol/l mit Ascorbinsäure 10^{-4} mol/l hatte einen größeren Effekt auf die Apoptoserate als einer der Stoffe in der gegebenen Konzentration alleine (Ulinastatin 10^{-7} mol/l plus Ascorbinsäure 10^{-4} mol/l: 35 %, Ulinastatin 10^{-7} mol/l: 43 %, Ascorbinsäure 10^{-4} mol/l: 45 %, Kontrolle: 62 %, s. Abb. 13).

3.4 Inkubation von HUVEC und Neutrophilen mit dem Serum eines Patienten mit tödlicher *Malaria tropica*: Wirkung von Anti-TNF- α -Antikörper

Abbildung 14: Einfluss von TNF- α und Neutrophilen auf die Apoptoserate von Endothelzellen bei tödlicher *Malaria tropica*



Blau: ohne Anti-TNF- α -Antikörper, rot: mit Anti-TNF- α -Antikörper (1 μ g/ml), n=2.

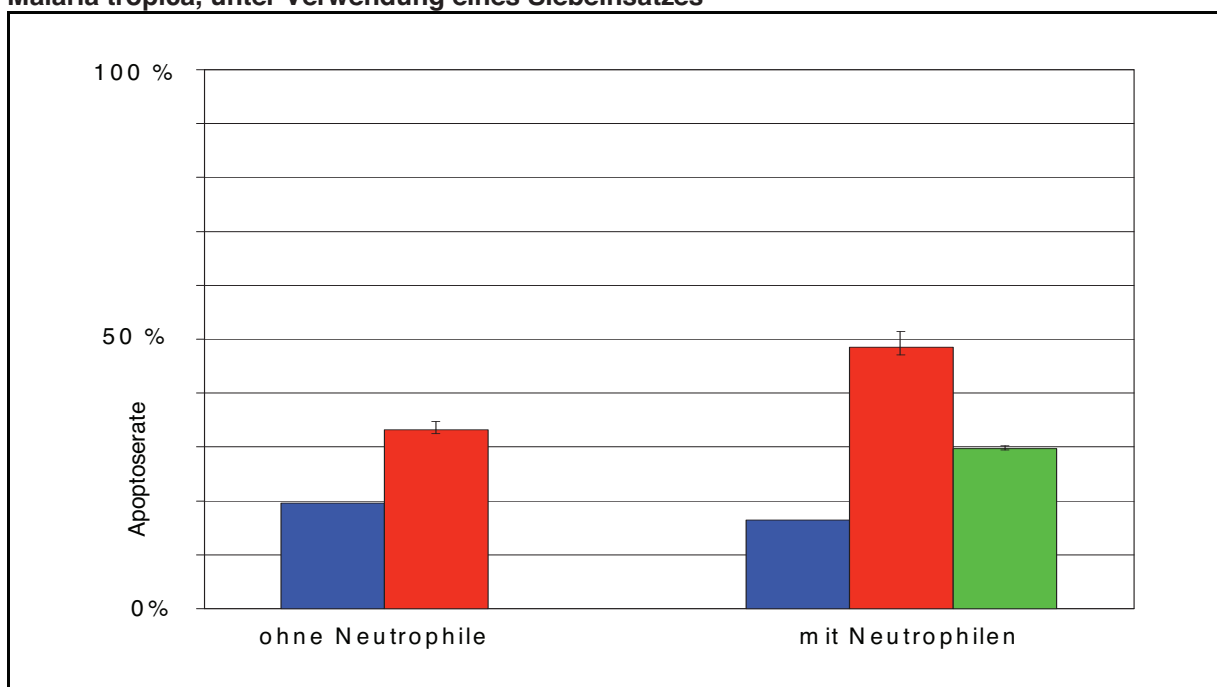
Bei der Inkubation von HUVEC mit Neutrophilen, Patientenseren und Anti-TNF- α -Antikörpern (1 μ g/ml) zeigte sich eine deutliche Abnahme der Apoptoserate im Vergleich zur Inkubation ohne Anti-TNF- α -Antikörper (Patient 1: 30 % vs. 50 %, Patient 2: 35 % vs. 47 %).

Anti-TNF- α -Antikörper (1 μ g/ml) bewirkten eine geringere Abnahme der Apoptoserate auch in Abwesenheit von Neutrophilen gegenüber dem Ansatz ohne Antikörper (Patient 1: 24 % vs. 33 %, Patient 2: 26 % vs. 33 %).

3.5 Inkubation von HUVEC mit Patientenserum und Neutrophilen unter Verwendung einer permeablen Membran

Um zu untersuchen, ob der direkte Kontakt zwischen Endothel und neutrophilen Granulozyten zur Induktion der Apoptose notwendig ist, wurden die Neutrophilen während der Inkubation mit einer permeablen Membran (Siebeinsatz) vom Endothel getrennt.

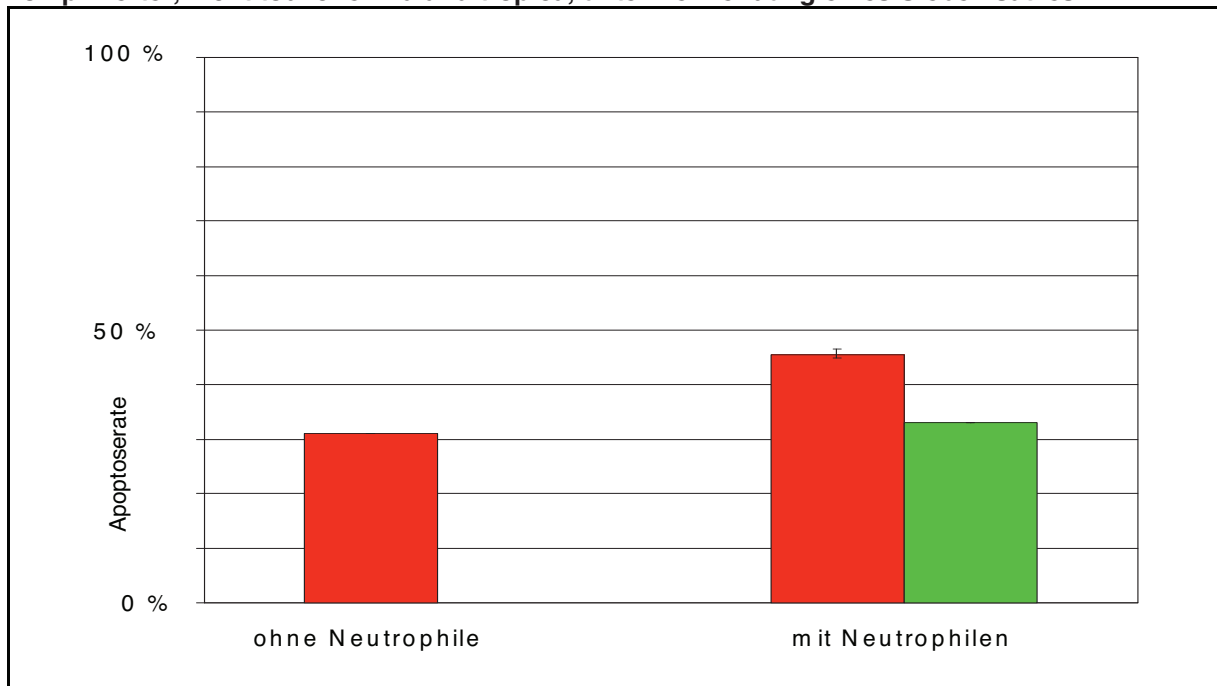
Abbildung 15: Einfluss von Neutrophilen auf die Apoptoserate von Endothelzellen bei tödlicher Malaria tropica, unter Verwendung eines Siebeinsatzes



Blau: Kontrollserum ohne Siebeinsatz, rot: Patientenserum ohne Siebeinsatz, grün: Patientenserum mit Siebeinsatz.

Wenn Neutrophile und HUVEC während der Inkubation durch einen Siebeinsatz getrennt wurden, war die Apoptoserate niedriger als bei der Inkubation ohne Siebeinsatz (30 % vs. 49 %, $n = 2$). Die Apoptoserate war bei Verwendung eines Siebeinsatzes etwa so hoch wie bei der Inkubation in Abwesenheit von Neutrophilen (33 %, $n=2$; s. Abb. 15).

Abbildung 16: Einfluss von Neutrophilen auf die Apoptoserate von Endothelzellen bei komplizierter, nicht tödlicher Malaria tropica, unter Verwendung eines Siebeinsatzes



Rot: Patientenserum ohne Siebeinsatz, grün: Patientenserum mit Siebeinsatz.

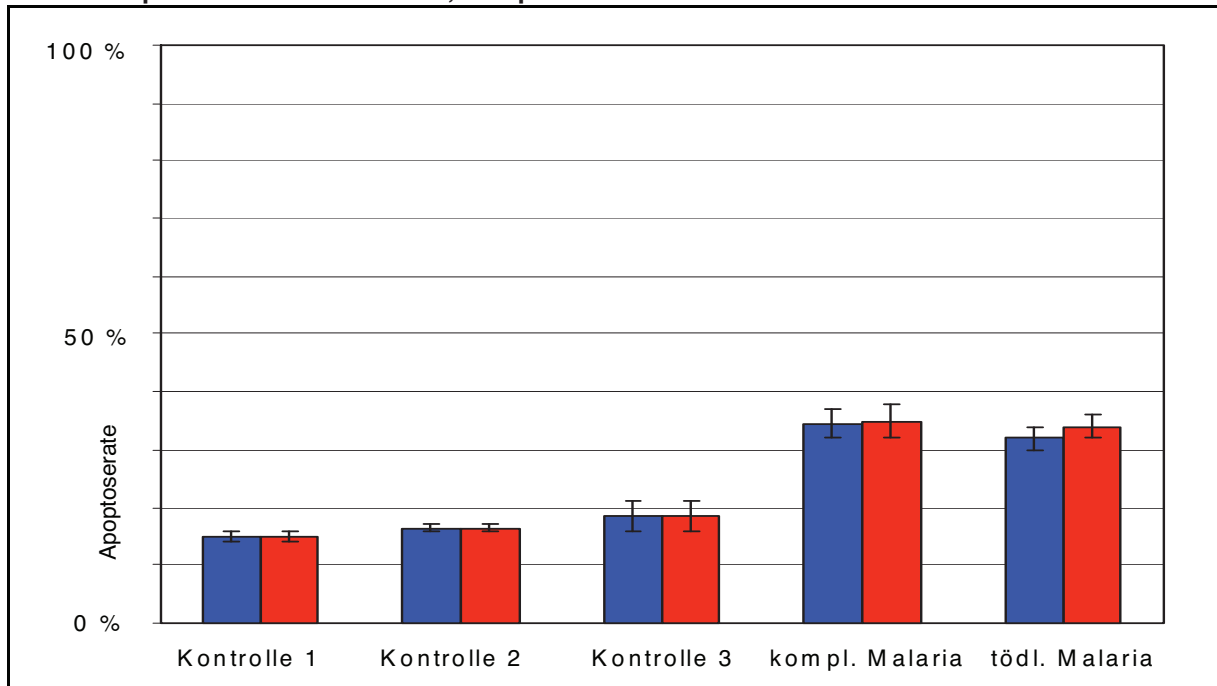
Die Inkubation von HUVEC mit Neutrophilen und Serum eines Patienten mit nicht tödlicher, komplizierter Malaria tropica zeigte unter Verwendung eines Siebeinsatzes eine erniedrigte Apoptoserate im Vergleich mit der Inkubation ohne Siebeinsatz (33 % vs. 46 %). Die Apoptoserate war bei Verwendung eines Siebeinsatzes etwa so hoch wie bei der Inkubation in Abwesenheit von Neutrophilen (31 %; s. Abb. 16).

3.6 Inkubation von HUVEC mit mononukleären Zellen und Patientenserum und die Wirkung verschiedener Hemmstoffe

Um zu prüfen, ob mononukleäre Zellen einen Effekt auf die Apoptoserate haben, wurde diese Zellpopulation auch separat untersucht.

3.6.1 Wirkung von mononukleären Zellen auf die Apoptoserate des Endothels bei Malaria tropica mit tödlichem bzw. nicht tödlichem, kompliziertem Verlauf

Abbildung 17: Einfluss von mononukleären Zellen auf die Apoptoserate der Endothelzellen bei Malaria tropica mit nicht tödlichem, kompliziertem und tödlichem Verlauf



Blau: Serum, rot: Serum mit mononukleären Zellen.

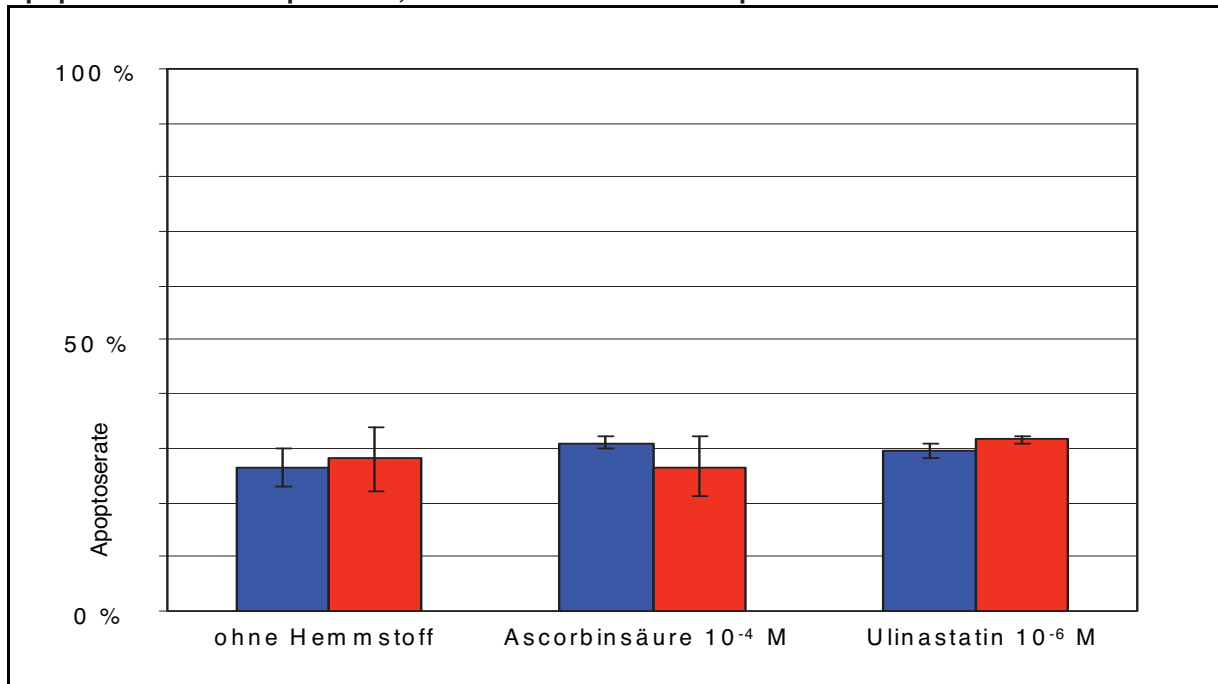
Bei dieser Serie erfolgten Kontrollen mit 3 Seren von 2 gesunden Probanden, wobei die Kontrollseren 1 und 2 vom gleichen Probanden stammen.

In diesem Experiment führt die Inkubation von HUVEC mit Serum eines Patienten mit tödlicher Malaria tropica oder eines Patienten mit nicht tödlicher, komplizierter Malaria tropica zu einer höheren Apoptoserate als die Inkubation mit Kontrollseren (tödliche M. tropica: 32 % vs. 17 %, komplizierte, nicht tödliche M. tropica: 35 % vs. 17 %).

Die Apoptoserate der HUVEC wird durch die Zugabe von mononukleären Zellen nicht erkennbar verstärkt (tödliche M. tropica: 34 % vs. 32%, komplizierte, nicht tödliche M. tropica: 35 % vs. 35%).

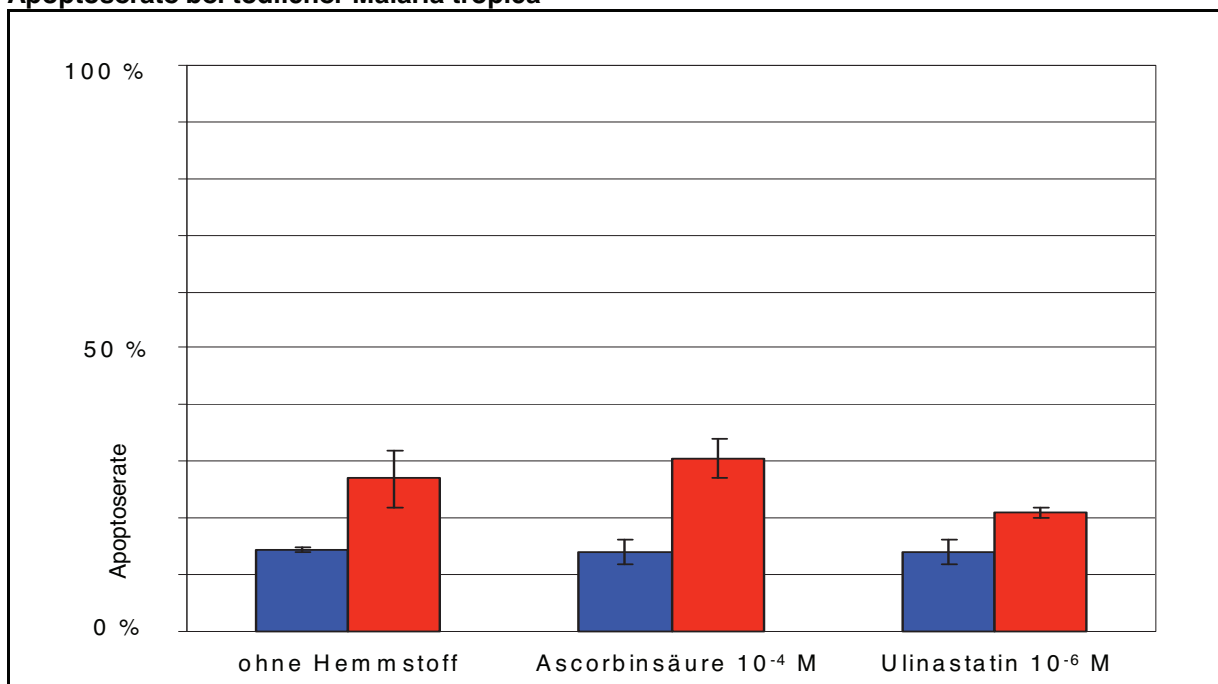
3.6.2 Wirkung von mononukleären Zellen auf die Apoptoserate des Endothels bei Malaria tropica mit kompliziertem, nicht tödlichem bzw. tödlichem Verlauf und der Einfluss von Hemmstoffen

Abbildung 18: Einfluss von mononukleären Zellen, Ascorbinsäure und Ulinastatin auf die Apoptoserate bei komplizierter, nicht tödlicher Malaria tropica



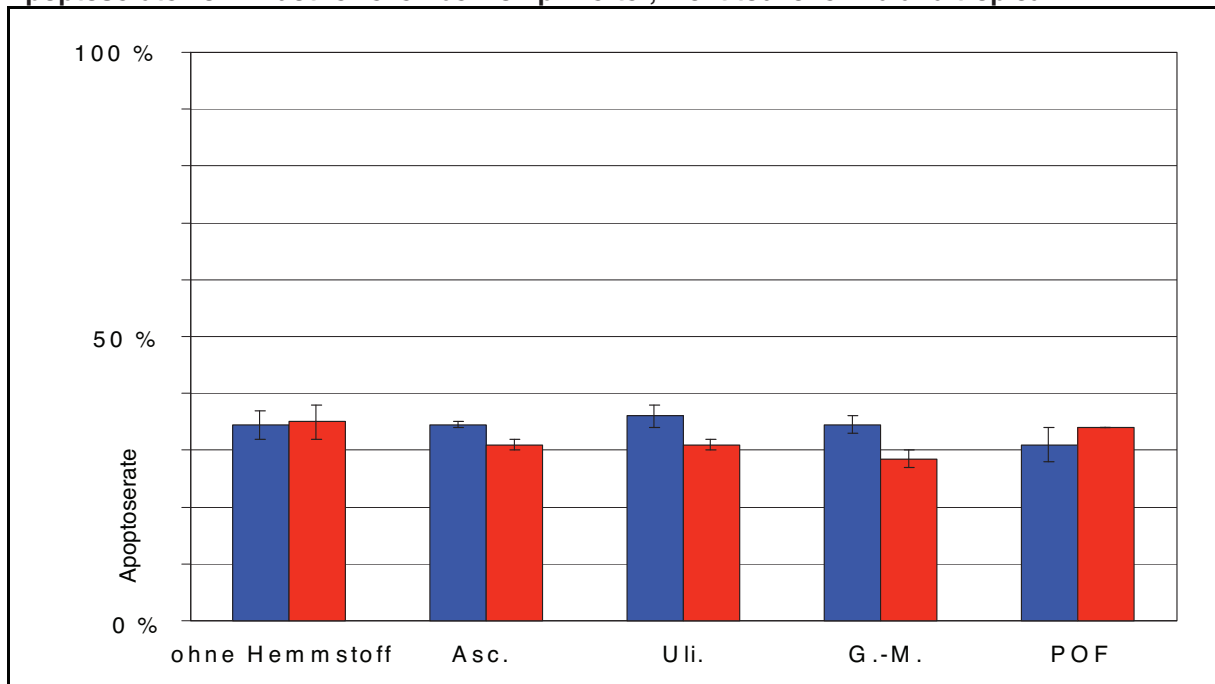
Blau: Kontrollserum mit mononukleären Zellen, rot: Patientenserum mit mononukleären Zellen.

Abbildung 19: Einfluss von mononukleären Zellen, Ascorbinsäure und Ulinastatin auf die Apoptoserate bei tödlicher Malaria tropica



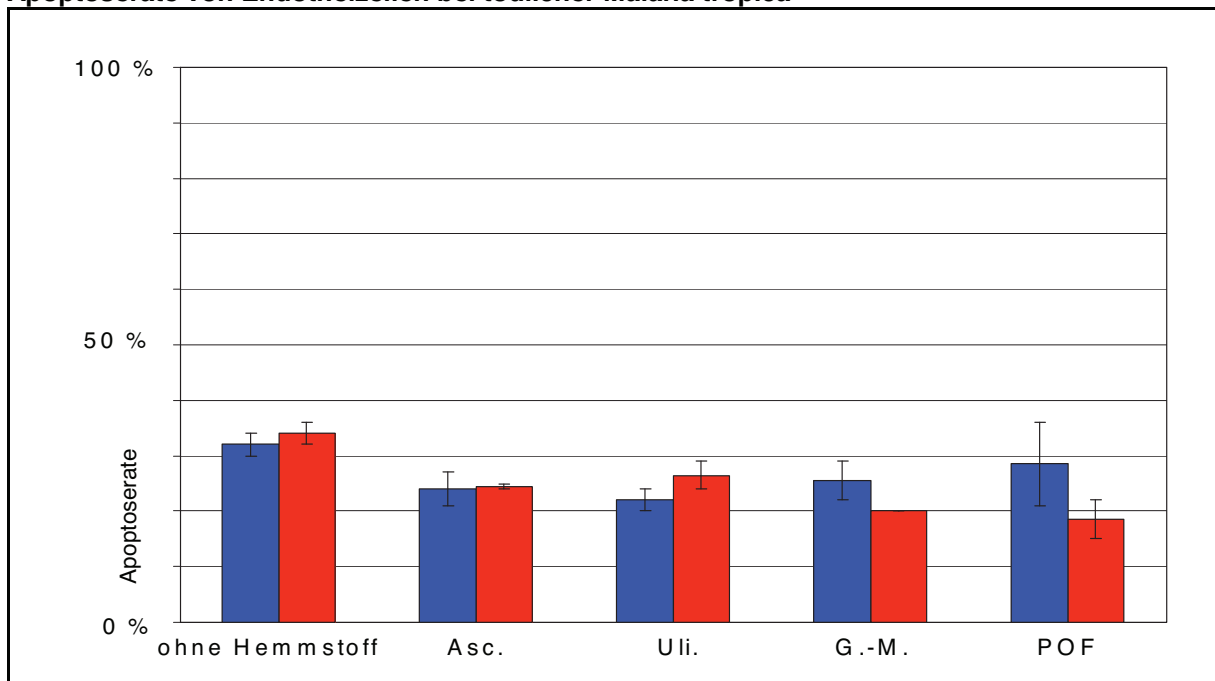
Blau: Kontrollserum mit mononukleären Zellen, rot: Patientenserum mit mononukleären Zellen.

Abbildung 20: Einfluss von mononukleären Zellen und verschiedenen Hemmstoffe auf die Apoptoserate von Endothelzellen bei komplizierter, nicht tödlicher Malaria tropica



Blau: Patientens serum ohne mononukleäre Zellen, rot: Patientens serum mit mononukleären Zellen. Asc.: Ascorbinsäure 10^{-4} M, Uli.: Ulinastatin 10^{-6} M, G.-M.: Gabexat-Mesilat 10^{-4} M, POF: Pentoxifyllin 10^{-4} M.

Abbildung 21: Einfluss von mononukleären Zellen und verschiedenen Hemmstoffe auf die Apoptoserate von Endothelzellen bei tödlicher Malaria tropica



Blau: Patientens serum ohne mononukleäre Zellen, rot: Patientens serum mit mononukleären Zellen. Asc.: Ascorbinsäure 10^{-4} M, Uli.: Ulinastatin 10^{-6} M, G.-M.: Gabexat-Mesilat 10^{-4} M, POF: Pentoxifyllin 10^{-4} M.

Weder Ascorbinsäure (10^{-4} mol/l) noch Ulinastatin (10^{-6} mol/l) bewirkten eine deutliche Verminderung der Apoptoserate in Anwesenheit mononukleärer Zellen. Für

Ascorbinsäure galt dies sowohl für Serum eines Patienten mit tödlicher Malaria tropica als auch für Serum eines Patienten mit nicht tödlicher, komplizierter Malaria tropica. Ulinastatin zeigte für Serum eines Patienten mit tödlicher M. tropica eine geringgradige Reduktion der Apoptoserate (21 % vs. 27 %).

Auch Gabexat-Mesilat (10^{-4} mol/l) und Pentoxifyllin (10^{-4} mol/l) beeinflussten nicht die Apoptoserate in Anwesenheit von mononukleären Zellen (s. Abb. 20 und Abb. 21).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Gewinnung und Kultivierung der Endothelzellen

Die enzymatische Ablösung von Endothelzellen aus menschlichen Nabelschnüren (HUVEC) und deren Kultivierung sind etablierte Standardmethoden, bei denen die Zellen wesentliche in-vivo-Eigenschaften auch während der Kultivierung beibehalten (Jaffe et al., 1973). Daher darf vermutet werden, dass an HUVEC in vitro gewonnene Ergebnisse relevant für die in-vivo-Situation sind. Das verwendete Endothelzellmodell ist im parasitologischen Labor der Universität Rostock etabliert.

4.1.2 Isolation von Blutzellen

Die untersuchten Zellen wurden mit hoher Reinheit isoliert. Mit den beschriebenen Verfahren (s. 2.4) ließen sich Thrombozyten und Erythrozyten ohne messbare Verunreinigungen durch andere Zellpopulationen (99,9 % Reinheit) isolieren. Neutrophile Granulozyten wurden mit einer Reinheit von 85 % bis 95 % isoliert, verunreinigende Zellen waren in der Mehrzahl Erythrozyten und Lymphozyten. Der Reinheitsgrad der isolierten mononukleären Zellen lag zwischen 96 % und 98 %, verunreinigende Zellen waren Thrombozyten und neutrophile Granulozyten. Dabei bestand das Isolat der mononukleären Zellen zu 65 % bis 74 % aus Lymphozyten und zu 24 % bis 33 % aus Monozyten.

Die Verwendung von Percoll bei der Isolation von Neutrophilen verspricht gegenüber anderen Verfahren eine geringere Aktivierung der Zellen (Jackson et al., 1989; Vanille et al., 1994). Die Isolation der mononukleären Zellen erfolgte mittels Ficoll-Gradient (Casale & Kaliner, 1982). Dabei konnten die Zellen in ausreichender Reinheit isoliert werden und so die in der Literatur berichteten Ergebnisse zur Güte der Methode bestätigt werden (Casale & Kaliner, 1982). Wesentliche Funktionen der Monozyten wie Zytokinproduktion und Phagozytose bleiben unter der Isolation, auch in Kombination mit weiteren Gradienten, erhalten (Vissers et al., 1988).

4.1.3 Pharmaka

Die Konzentrationen der Substanzen, die auf apoptosehemmende Wirkung untersucht wurden, wurden so gewählt, dass sie die in der klinischen Anwendung erreichbaren Plasmaspiegel berücksichtigen.

4.1.4 Apoptosenachweis

Zum Nachweis der Apoptose können unterschiedliche Nachweismethoden angewandt werden. Neben Verfahren, die eine erhöhte intrazelluläre Caspasenaktivität mittels ELISA oder die spezifische DNA-Strangbrüche (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARP)) mittels Western Blot nachweisen, bieten sich hier Verfahren an, bei denen die Endothelzellen im Kulturverband erhalten bleiben und mit apoptosespezifischen Färbungen markiert werden. Auf diese Weise kann der Anteil der apoptotischen Endothelzellen in der Kultur mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden.

Das verwendete TUNEL-Verfahren (s. 2.6.) gilt als spezifische und sensitive Methode zum Nachweis von Apoptose.

Gegenüber der Markierung von DNA-Strang-Brüchen mit Nukleotiden unter Verwendung der DNA-Polymerase (Nick-Translation, ISNT), mit der man ebenfalls spezifisch Apoptose nachweisen kann, zeigt das TUNEL-Verfahren eine deutlich höhere Sensitivität (Gorczyca et al., 1993) und erlaubt durch die Verwendung des Markers Fluorescein-dUTP eine direkte optische Auswertung.

Einige Autoren berichteten über Defizite der TUNEL-Methode in Bezug auf Sensitivität, Spezifität und Stabilität gegenüber Nachbehandlungen wie Fixierungen. Auch soll sich das Färbeverhalten der Zellen im Verlauf des Apoptoseprozesses ändern (Negoescu et al., 1996; Labat-Moleur et al., 1998).

Ein Vergleich mit der Annexin V-Propidiumiodid-Methode, die die Differenzierung nekrotischer und apoptotischer Zellen erlaubt, zeigte für das experimentelle Setup unserer Arbeitsgruppe vergleichbare Ergebnisse beider Methoden (Hemmer et al., 2005). Wesentliche Nachteile dieser Methode bestehen in der Notwendigkeit einer 2-fachen Färbung und der fehlenden Möglichkeit zur Fixierung.

Um den systematischen Fehler unterschiedlicher Anfärbbarkeit durch Veränderungen der Kernstrukturen im Verlauf der Apoptose zu vermeiden, wurde ein einheitliches Protokoll zum Ablauf der Experimente und zum Zeitpunkt der Fixierung streng eingehalten.

4.2 Genese des Endothelschadens bei Malaria

Die Ergebnisse verschiedener Arbeiten zur Histopathologie bei Malaria (MacPherson et al., 1985; Oo et al., 1987) zeigen, dass im Rahmen der Malariaerkrankung Endothelschaden auftritt. Dies scheint ein wesentlicher Pathomechanismus bei der Entstehung von Organschäden im Sinne eines „vascular leakage“-Syndroms zu sein (Horstmann et al., 1981 und 1985). Neutrophile Granulozyten können zum Endothelschaden bei Malaria beitragen (Hemmer et al., 1994). Sie setzen reaktive Sauerstoffspezies und Proteasen (Elastase) frei. Diese Substanzen können in niedrigen Konzentrationen Apoptose und in höheren Konzentrationen Nekrose auslösen (Burlacu et al., 2001).

Die vorliegenden Experimente zeigen im Einklang mit ergänzenden Befunden unserer Arbeitsgruppe, dass es sich im Wesentlichen um apoptotischen Endothelschaden handelt (Hemmer et al., 2005).

4.3 Die Rolle unterschiedlicher Blutzellpopulationen und die Rolle von TNF- α bei der Entstehung von Endothelschaden bei Malaria tropica

Zielstellung der Arbeit war, diejenigen Blutzellpopulationen zu identifizieren, die alleine zum Entstehen von Endothelschaden beitragen. Dazu wurden kultivierte Endothelzellen mit der jeweiligen Population der Blutzellen und Patientenserum 70 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen der 96-Well-Platten gespült und mit Medium versetzt. Dadurch wurden die Blutzellen wieder entfernt.

Die Inkubationszeit von 70 Minuten reicht nicht aus, um die dabei induzierten Adhäsionsmoleküle (E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1) maximal zu exprimieren (Bevilacqua et al., 1994; Ockenhouse et al., 1992). Daher erfolgte eine 4-stündige Nachinkubation mit normalem Endothelzellmedium, so dass die Expression von Genen und die Veränderungen in den Endothelzellen, die während der ersten (i.e. 70-minütigen) Inkubation ausgelöst wurden, zum Tragen kommen konnten.

4.3.1 Erythrozyten und Endothelschaden bei Malaria

In den vorgestellten Experimenten führten nichtparasitierte Erythrozyten in Gegenwart von Patientenserum nicht zur Induktion von Apoptose in Endothelzellen, unabhängig vom Schweregrad der Malaria tropica.

Der Beitrag parasitierter Erythrozyten zur Apoptose ist bereits belegt (Pino et al., 2003). Die Erythrozyten binden über Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche des Endothels (Sequestration). Dies wurde histologisch an Kapillaren verschiedener Organe von Patienten nachgewiesen, die an komplizierter Malaria verstorben waren (Pongponratn et al., 1991; Turner et al., 1994; Garcia et al., 1999; MacPherson et al., 1985; Oo et al., 1987; Patnaik et al., 1994; Ho & White, 1999). Dabei kann es zur Verlegung des Gefäßlumens und zur lokalen Produktion proinflammatorischer Zytokine kommen (Miller et al., 2002).

Allerdings ist die Bedeutung der Apoptoseinduktion durch adhätierende parasitierte Erythrozyten für die Entwicklung von Organkomplikationen bei Malaria tropica in vivo noch nicht völlig geklärt. Zum einen vermindern die bei der Malariatherapie verwendeten Medikamente die Endotheladhärenz parasitierter Erythrozyten (Udomsangpetch et al., 1996), und zum anderen treten klinische Komplikationen häufig erst nach Therapiebeginn auf, also nachdem die Parasitämie bereits abgenommen hat (Horstmann et al., 1985).

Es erscheint daher unzureichend, den Focus nur auf die Interaktion der parasitierten Erythrozyten mit dem Endothel zu legen, vielmehr scheinen andere Mechanismen ebenfalls von Bedeutung zu sein.

4.3.2 Thrombozyten und Endothelschaden bei Malaria

Im murinen Modell beeinflussen jedoch die Thrombozyten das Ausprägungsbild der Malaria. So konnte durch die Gabe eines monoklonalen Antikörpers (Anti-LFA-1-Mab) die Sequestration der Thrombozyten verhindert werden. Parallel dazu wurde eine Abnahme der cerebralen Komplikationen im Mausmodell beobachtet (Lou et al., 2001). Weiterhin schützte auch das Fehlen von endotheliale P-Selektin (Thrombozytenrezeptor) im murinen Modell vor cerebralen Komplikationen (Combes et al., 2004). Bei Malaria tropica des Menschen ist eine starke Aktivierung der Thrombozyten bereits seit längerem bekannt (Essien & Ebhota, 1983). Die Thrombozytopenie korreliert mit der Parasitämie (Horstmann & Dietrich, 1985).

Im vorliegenden Modell wurden gezielt einzelne Zellpopulationen auf ihre Wirkung am Endothel hin untersucht. Es ist durchaus denkbar, dass im weiteren Verlauf im Rahmen wechselseitiger Aktivierung, insbesondere nach Schädigung des Endothels durch beispielsweise Neutrophile, Thrombozyten am Pathomechanismus teilnehmen.

In den hier vorgestellten in-vitro-Experimenten haben Thrombozyten den apoptose-induzierenden Effekt des Patientenserums auf die Endothelzellen nicht verstärkt. Dies könnte daran liegen, dass Thrombozyten dies nur im Zusammenwirken mit weiteren Blutzellpopulationen tun.

4.3.3 Mononukleäre Zellen und Endothelschaden bei Malaria

Monozyten und Makrophagen können in vivo und in vitro durch Plasmodienantigene und parasitierte Erythrozyten aktiviert werden (Bate et al., 1988; Bate et al., 1989; Taverne et al., 1990b; Schofield & Hackett, 1993). Aktivierte Monozyten und Makrophagen sezernieren proinflammatorische Zytokine sowie Sauerstoffradikale und Proteasen (Cotran & Pober, 1990). Somit ist die Wirkung von Sekretionsprodukten dieser Zellen auf das Gefäßendothel ein denkbarer Mechanismus des Endothelschadens bei Malaria.

Auch für die Aktivierung von Lymphozyten gibt es in der Literatur Hinweise. Im Falle der B-Lymphozyten findet sich eine vermehrte Produktion von malariaspezifischen sowie unspezifischen Antikörpern (Perlmann & Troye-Blomberg, 2002). Im Falle der T-Lymphozyten zeigen sich erhöhte Plasmaspiegel der Aktivierungsmarker und

Oberflächenrezeptoren der T-Zellen (Elhassan et al., 1994). Dabei handelt es sich um lösliche Formen des Interleukin-2-Rezeptors (sIL-2R), von CD4 (sCD4), CD8 (sCD8) und Beta-2-Mikroglobulin. Die Konzentrationen des sIL-2R korrelieren mit den erhöhten Konzentrationen der löslichen endothelialen Adhäsionsrezeptoren „Intercellular Adhesion Molecule 1“ (ICAM-1) und E-Selektin (Hviid et al., 1993). Gleichzeitig exprimieren die zirkulierenden T-Lymphozyten, deren Anzahl während der akuten Malaria im Blut vermindert ist, vermehrt das Leukozytenfunktionsantigen 1 (LFA-1), welches ein Ligand des ICAM-1 ist (Hviid et al., 1993). Dies weist auf eine mögliche Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Endothelzellen bei komplizierter Malaria hin, zumal cerebrale Malariakomplikationen im Mausmodell durch Entfernung sowohl der CD4-Lymphozyten, als auch der CD8-Lymphozyten verhindert werden können (Grau et al., 1986; Yanez et al., 1996; Hermesen et al., 1997).

Die vorgestellten Experimente zeigen jedoch keinen reproduzierbaren Effekt der mononukleären Zellen auf die Apoptoserate der Endothelzellen. In einem einzelnen Experiment (s. Abb. 5) wurde eine Erhöhung der Apoptoserate durch mononukleäre Zellen beobachtet. Dies ließ sich in weiteren Experimenten nicht bestätigen (s. Abb. 17, 20 und 21). Möglicherweise gab es Differenzen im Aktivierungszustand der verwendeten mononukleären Zellen bereits zum Zeitpunkt der Isolation. Hier kann bereits eine banale Erkältung oder eine andere banale Viruserkrankung des Spenders eine Rolle spielen, da diese Zellen bei der Abwehr von Viruserkrankungen eine besondere Rolle spielen. Bei Neutrophilen wäre eine solche in-vivo-Aktivierung durch Viruserkrankungen wahrscheinlich weniger stark ausgeprägt.

4.3.4 Neutrophile Granulozyten und Endothelschaden bei Malaria, Bedeutung der direkten Wechselwirkung mit dem Endothel und der Aktivierung durch TNF- α

In den hier vorgestellten Experimenten haben neutrophile Granulozyten die proapoptotische Wirkung von Patientenserum auf Endothelzellen verstärkt. Dieser Effekt war bei Serumproben von komplizierten Fällen deutlicher ausgeprägt als bei leichten Fällen der *M. tropica*.

Dies passt gut zu anderen Befunden aus der Literatur. In vitro können aktivierte Neutrophile einen Endothelschaden induzieren (Westlin & Gimbrone, 1993; Hemmer

et al., 1994). Bei Malaria korreliert die Höhe des Thrombomodulin-Plasmaspiegels als Indikator für die Endothelschädigung mit dem Plasmaspiegel der Humanen Neutrophilen-Elastase als Indikator für die Neutrophilen-Aktivierung sowie der Parasitämie und der klinischen Schwere der Erkrankung (Hemmer et al., 1994; Boehme et al., 1994). Ergänzend weisen erhöhte Serumspiegel von ICAM-1 und E-Selektin, die von geschädigten Endothelzellen freigesetzt werden, auf Endothelschaden bei Malaria tropica hin (Turner et al., 1998).

Untersuchungen am murinen Malaria-Modell bestätigen die Bedeutung der Neutrophilen für die Komplikationen bei Malaria. Cerebrale Komplikationen einer P. berghei-Malaria blieben aus, wenn die Neutrophilen vor dem Auftreten cerebraler Komplikationen aus dem Blut der Tiere entfernt wurden, oder wenn sie durch Gabe von Anti-LFA1-Antikörpern an der Interaktion mit dem Gefäßendothel gehindert wurden (Grau et al., 1991; Chen et al., 2000).

Die ergänzenden Experimente mit Neutrophilen unter Verwendung eines Siebeinsatzes legen nahe, dass für den durch Neutrophile induzierten Endothelschaden bei Malaria ein direkter Kontakt von Neutrophilen mit dem Endothel notwendig ist.

Die Experimente mit Antikörpern gegen TNF- α zeigen ergänzend, dass der proapoptotische Effekt der Neutrophilen zumindest teilweise von TNF- α abhängt. In Anwesenheit von Neutrophilen reduzieren Antikörper gegen TNF- α den proapoptotischen Effekt des Patientenserums auf das Niveau, das auch in Abwesenheit von Neutrophilen gesehen wird (s. Abb. 14). Dem entspricht die Beobachtung bei muriner Malaria in vivo, dass durch Gabe von Anti-TNF- α -Antikörpern cerebrale Komplikationen, die von einer verstärkten TNF- α -Freisetzung begleitet werden (Combes et al., 2004), verhindert werden (Grau et al., 1987). Da TNF- α die Expression von ICAM-1 durch Endothelzellen verstärkt, könnte es zur Bindung von neutrophilen Granulozyten und von parasitierten Erythrozyten beitragen. Ferner kann TNF- α die Neutrophilen aktivieren (Shalaby et al., 1985; Shalaby et al., 1987), was die Bindung an Endothelzellen verstärkt.

4.3.5 Induktion von Endothelzellapoptose durch Patientenserum

In den vorliegenden Experimenten hat auch Patientenserum in Abwesenheit von Blutzellen die Apoptoserate von Endothelzellen erhöht (s. Abb. 17). Dies spricht dafür, dass Mediatoren, die bei Malariaerkrankten im Blut zirkulieren, Apoptose in Endothelzellen auslösen, so ist in der Literatur ein apoptotischer Effekt von TNF- α auf Endothelzellen beschrieben (z. B. Robaye et al., 1991).

4.4 Wirkung verschiedener Hemmsubstanzen auf die Verhinderung der Endothelapoptose unter dem Einfluss neutrophiler Granulozyten

Von den hier untersuchten Blutzellpopulationen trugen nur die neutrophilen Granulozyten eindeutig zur Endothelzellapoptose im verwendeten in-vitro-Modell bei. Daher wurde versucht, die Endothelzellapoptose durch Substanzen zu behindern, die die Funktion der Neutrophilen hemmen oder Sekretionsprodukte der Neutrophilen neutralisieren können. Hierzu wurden Substanzen ausgewählt, die auch zur klinischen Anwendung beim Menschen zugelassen sind, nämlich die Antioxidantien Ascorbinsäure (Vitamin C) und Tocopherol, die Protease-Inhibitoren Ulinastatin und Gabexat-Mesilat sowie das Methyl-Xanthin-Derivat Pentoxifyllin (Phosphodiesterase-Hemmer).

4.4.1 Ascorbinsäure

Aktivierte Neutrophile können das Endothel durch Sekretion reaktiver Sauerstoffspezies schädigen (Westlin & Gimbrone, 1993). Ascorbinsäure neutralisiert reaktive Sauerstoffspezies und vermindert deren Produktion, z. B. über die Hemmung der Peroxidase (Williams et al., 1984). Ascorbinsäure verhindert auch bei der dekompensierten Herzinsuffizienz die Apoptose von Gefäßendothelzellen in vitro und in vivo (Rössig et al., 2001).

Im untersuchten in-vitro-Modell der Malaria wurde eine dosisabhängige Hemmung der durch Neutrophile verstärkten Endothelzellapoptose durch Ascorbinsäure beobachtet (s. Abb. 9). Dabei zeigte sich keine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung, sondern die Experimente lassen eine Schwelle für die Wirkung bei einer

Konzentration von etwa 10^{-4} M vermuten. Plasmaspiegel in dieser Höhe sind bei gesunden Probanden mit oraler Gabe jedoch schwer zu erreichen (Levine et al., 1996). Andererseits wurden bei adoleszenten Malariapatienten Serumspiegel in dieser Höhe gefunden (Hassan et al., 2004), möglicherweise als Folge von Ascorbinsäurefreisetzung aus Leukozyten. In der Literatur finden sich andererseits auch Berichte über erniedrigte Ascorbinsäurespiegel bei Malaria tropica (Das & Nanda, 1999), insbesondere bei Kindern (Hassan et al., 2004). Daraus könnten sich therapeutische Konsequenzen ergeben. Ob Ascorbinsäure bei komplizierter M. tropica einen Nutzen bewirkt und bei welchen Patienten, wäre in einer klinischen Studie zu prüfen, unter Einschluss intravenöser Applikation, da hier höhere Plasmakonzentrationen erreicht werden können (Padayatty et al., 2004).

4.4.2 Tocopherol

Tocopherol neutralisiert als Antioxidans reaktive Sauerstoffspezies und bildet dann selbst, durch Mesomeriestabilisierung, ein reaktionsträges Radikal. Dadurch hat es nur eine schwache oxidierende Wirkung. Tocopherol hemmt außerdem Caspasen und wirkt damit auch unabhängig vom antioxidativen Effekt apoptosehemmend (Uemura et al., 2002). Bei Malariapatienten ist die Konzentration des Antioxidans Tocopherol erniedrigt (Das & Nanda, 1999).

Im untersuchten in-vitro-Modell der Malaria wurde eine dosisabhängige Hemmung der durch Neutrophile induzierten Endothelzellapoptose durch Tocopherol beobachtet (s. Abb. 8). Tocopherol hat jedoch erst ab einer Konzentration von etwa 10^{-3} M eine deutliche antiapoptotische Wirkung. Da diese Konzentration beim Menschen im Serum kaum zu erreichen ist, dürfte Tocopherol zur Anwendung bei der M. tropica des Menschen weniger geeignet sein, auch wenn diese Substanz im Mausmodell cerebrale Komplikationen verhindern konnte (Thumwood et al., 1989).

4.4.3 Ulinastatin

Ulinastatin hemmt Serinproteasen, darunter auch die Neutrophilen-Elastase (Jonsson et al., 1982; Nakatani et al., 2001). Außerdem wird ein direkter Effekt auf die Neutrophilen mit Hemmung der Produktion und Sekretion der Neutrophilen-Elastase diskutiert (Nakatani et al., 2001).

Die beobachteten Effekte von Ulinastatin auf die Endothelzellapoptose zeigen eine weitgehend kontinuierliche Wirkungszunahme bei steigenden Konzentrationen oberhalb 10^{-10} M (s. Abb. 10).

Ulinastatin verbessert bei pädiatrischen Patienten, die sich einer Operation unter Anwendung einer Herz-Lungen-Maschine unterziehen müssen, den pulmonalen Sauerstoffaustausch in vivo (Sugita et al., 2002). In Tierversuchen konnte ein Benefit im Outcome schwerer septischer Krankheitsbilder gezeigt werden (Murata et al., 1994; Tani et al., 1993). Ob Ulinastatin bei komplizierter *M. tropica* einen Nutzen bewirkt, wäre in einer klinischen Studie zu prüfen.

4.4.4 Gabexat-Mesilat

Obwohl Gabexat-Mesilat sowohl die Freisetzung von ROS durch Neutrophile als auch die Chemotaxis hemmt (Mikawa et al., 1994) und die Expression von ICAM-1 auf den Endothelzellen negativ beeinflusst (Aosasa et al., 1998), konnte in der vorliegenden Arbeit nur ein sehr geringer hemmender Effekt auf die Induktion von Apoptose beobachtet werden (s. Abb. 11). Wahrscheinlich hemmt Gabexat-Mesilat, im Gegensatz zu Ulinastatin, nicht die Neutrophilen-Elastase (Nakatani et al., 2001). Die fehlende Wirkung von Gabexat-Mesilat könnte somit ein Hinweis darauf sein, dass die Wirkung des Ulinastatins in erster Linie auf einer direkten Hemmwirkung gegenüber der Neutrophilen-Elastase beruht.

4.4.5 Pentoxifyllin (POF)

Pentoxifyllin hemmt bei muriner Malaria den Anstieg der TNF- α -Konzentration im Serum und verhindert cerebrale Komplikationen (Kremsner et al., 1991). Beim Menschen wurde jedoch in mehreren Studien kein klinischer Nutzen beobachtet und, abgesehen von extrem hohen Dosen, kein Einfluss auf die TNF- α -Serumspiegel gesehen (Hemmer et al., 1997; Wenisch et al., 1998; Looareesuwan et al., 1998). Im Mausmodell scheint durch Pentoxifyllin die verminderte TNF- α -Freisetzung zu einer Verminderung der Leukozytenadhäsion am Endothel zu führen (Kremsner et al., 1991; Boogaerts et al., 1990). TNF- α trägt zur Adhäsion von Neutrophilen am Endothel bei, indem es Endothelzellen aktiviert und die Expression von Adhäsionsmolekülen hochregelt. POF vermindert die Adhäsion dabei auf zwei

Ebenen, durch Hemmung der TNF- α -Freisetzung und durch Hemmung der durch TNF- α induzierten E-Selektin-Expression am Endothel (Bahra et al., 2001).

Im hier verwendeten in-vitro-Modell wurde POF zusammen mit dem Patientenserum eingesetzt. Neutrophile bilden selbst kein TNF- α . Eine hemmende Wirkung von POF auf die TNF- α -Freisetzung wurde somit ausgeschaltet, so dass es nur durch die Hemmung nachgeschalteter Mechanismen hätte wirken können. Hierbei wäre eine Wirkung von POF auf Neutrophile, u. a. durch Hemmung der Sekretion aus den Granula (Sullivan et al., 1988; Deree et al., 2006) oder auf Endothelzellen (Kudoh et al., 1995; Coe et al., 1997) denkbar.

Im untersuchten Modell der Malaria tropica hatte POF keine hemmende Wirkung auf die Endothelzellapoptose (s. Abb. 12), dagegen konnte mittels TNF- α -Antikörpern der Anteil geschädigter Endothelzellen reduziert werden. TNF- α scheint also über Mechanismen zu wirken, die wesentlich zur Endothelschädigung durch Neutrophile beitragen, aber nicht durch POF hemmbar sind. Somit ist eine Wirkung über die Unterdrückung der Hochregulation von E-Selektin (Bahra et al., 2001) im vorliegenden Modell wenig wahrscheinlich.

4.4.6 Kombination von Ulinastatin und Ascorbinsäure

Sowohl Ulinastatin als auch Ascorbinsäure zeigten in den vorliegenden Experimenten einen hemmenden Effekt auf die Endothelschädigung durch Neutrophile. Wegen der unterschiedlichen Wirkcharakteristika stellte sich die Frage nach einem möglichen Kombinationseffekt.

In den hier vorgestellten Experimenten hatte die Kombination von Ascorbinsäure und Ulinastatin einen stärker hemmenden Effekt auf die Endothelschädigung als jeder der Hemmstoffe alleine. Ob dieser Kombinationseffekt eine biologische Bedeutung hat, ist offen. An der isolierten Rattenlunge wurde eine Endothelschädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Neutrophilen-Elastase induziert, wobei die Schädigung am ausgeprägtesten war, wenn zunächst ROS, dann Neutrophilen-Elastase appliziert wurde (Baird et al., 1986). Dies könnte darauf beruhen, dass reaktive Sauerstoffspezies Protease-Inhibitoren zerstören, die sonst das Endothel vor einer Schädigung durch Elastase schützen könnten (Stief & Heimbürger, 1988).

4.5 Wirkung verschiedener Hemmsubstanzen auf die Verhinderung der Endothelapoptose in Anwesenheit und Abwesenheit mononukleärer Zellen

Wie oben diskutiert, konnte eine Wirkung von mononukleären Zellen auf die Apoptoserate der Endothelzellen nicht eindeutig belegt werden.

Nur in einem Experiment mit Serum eines Patienten, der an *M. tropica* verstarb, zeigte sich eine leichte Verringerung der Apoptoserate nicht nur durch Ascorbinsäure und Ulinastatin, sondern auch durch Gabexat-Mesilat und Pentoxifyllin (s. Abb. 21). Eine ähnliche Tendenz ist bei Serum von komplizierter, nicht tödlicher *M. tropica* angedeutet (s. Abb. 20). Ascorbinsäure und Ulinastatin bewirken ferner keine reproduzierbare Apoptosehemmung in An- oder Abwesenheit von mononukleären Zellen (s. Abb. 18 und 19). Dies steht im Einklang mit der Annahme, dass die antiapoptotische Wirkung dieser Substanzen im Wesentlichen auf Neutralisierung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Ascorbinsäure sowie Neutralisierung von Elastase durch Ulinastatin beruht, die durch Neutrophile, aber nicht oder nur kaum durch mononukleäre Zellen sezerniert werden.

5 Zusammenfassung

Malaria ist die häufigste parasitäre Infektionskrankheit weltweit und führt zu 1,5 - 2,7 Millionen jährlichen Todesfällen.

Malaria tropica zeichnet sich durch ein besonders hohes Risiko für ein letal verlaufendes Multiorganversagen aus, dabei spielt die Endothelschädigung pathogenetisch eine zentrale Rolle.

Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus des Endothelschadens und die Rolle unterschiedlicher Blutzellpopulationen dabei zu untersuchen. Versuche mit Hemmstoffen sollten einen Ausblick auf mögliche Therapieoptionen eröffnen.

Endothelzellen aus Nabelschnurvenen wurden mit Serum von Malariapatienten bzw. von gesunden Kontrollpersonen in An- und Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten, mononukleären Zellen (i. e. Lymphozyten und Monozyten), Thrombozyten oder Erythrozyten inkubiert. Anschließend wurden die apoptotischen Endothelzellen mittels TUNEL-Färbung markiert und der Anteil der apoptotischen Zellen ermittelt.

Ferner wurde untersucht, ob Ascorbinsäure, Tocopherol, Ulinastatin, Gabexat-Mesilat oder Pentoxifyllin die Endothelzellen vor Schädigung schützen kann.

Mittels Antikörper gegen TNF- α wurde die Rolle dieses Zytokins in der Auslösung von Apoptose in Gegenwart von neutrophilen Granulozyten und Patientenserum untersucht. Durch Verwendung von Siebeinsätzen wurde untersucht, ob die Steigerung der Apoptoserate von Endothelzellen durch Neutrophile den direkten Kontakt zwischen Neutrophilen und Endothel erfordert.

Nach Inkubation der Endothelzellen mit Serum von Malariapatienten wurden höhere Apoptoseraten der Endothelzellen beobachtet als nach Inkubation mit Serum von gesunden Kontrollpersonen.

Die apoptoseinduzierende Wirkung von Patientenserum wurde durch neutrophile Granulozyten deutlich verstärkt, nicht jedoch durch Thrombozyten oder Erythrozyten. Ein reproduzierbarer Effekt von mononukleären Zellen wurde nicht festgestellt. Hier wären weitere Experimente erforderlich.

Der proapoptotische Effekt von Patientenserum in Kombination mit Neutrophilen konnte durch Ascorbinsäure, Tocopherol und Ulinastatin gehemmt werden, nicht jedoch durch Gabexat-Mesilat oder Pentoxifyllin.

Hemmversuche mit Antikörpern gegen TNF- α zeigten, dass TNF- α im Patientenserum zur Apoptoseinduktion durch Neutrophile beiträgt. Ferner zeigten Versuche mit Siebeinsätzen, dass neutrophile Granulozyten für ihren proapoptotischen Effekt den direkten Kontakt mit den Endothelzellen benötigen.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass Apoptose wesentlich zum Endothelschaden bei Malaria beiträgt.

Dabei scheint den neutrophilen Granulozyten und ihren Sekretionsprodukten (insbesondere ROS und HNE) neben Bestandteilen des Patientenserums (insbesondere TNF- α) eine besonders wichtige Rolle zuzukommen.

Die Neutralisation von ROS mit Ascorbinsäure und die Hemmung von Elastase durch Ulinastatin sind ein denkbarer therapeutischer Ansatz zur Verhinderung des apoptotischen Endothelschadens. Dies müsste jedoch in klinischen Studien geprüft werden.

Da die neutrophilen Granulozyten für ihre proapoptotische Wirkung den direkten Kontakt zu den Endothelzellen zu benötigen scheinen, sollte ferner untersucht werden, welche Rezeptoren hier beteiligt sind. Hieraus könnten sich weitere therapeutische Ansätze zur Verhinderung des Endothelschadens ergeben.

Material

Geräte

Inversions-Fluoreszenzmikroskop

Axiovert

Zeiss, Jena

Elektronisches Lichtmikroskop

Typ CK40-F200

Olympus optical, Japan

CO₂-Brutschrank

Heraeus, Hanau

CELL-DYN 3500

Abbott Laboratories, USA

Zentrifuge Biofuge stratos

Heraeus Instruments

Baujahr 1999

Utensilien

Kulturflaschen

Merck Eurolag GMBH

SFCA-Bottle Top Filter

Nalgene, USA

0,2 µm Pore Size

Well-Platten (96er)

NunclonTM Delta Surface,
Dänemark

Well-Platten mit Siebeinsatz

Nunc, Wiesbaden & Costar-
Corning, Schiphol, Niederlande

Pharmaka

Ascorbinsäure (Vitamin C)

Jenapharm, Jena

Gabexat-Mesilat

Ono Pharmaceutical Co., Osaka,
Japan

Pentoxifyllin

Sigma, München

Ulinastatin

Mochida Co., Tokyo, Japan

Tocopherol

Sigma, München

Reagenzien

Albumin , Rind, Fraktion V, 96 %	Sigma, USA
Antibiotic Antimycotic Solution , steril (10.000 units Penicillin + 10 mg Streptomycin + 25 µg Amphotericin B)/ ml	Sigma, USA
bECGF sterile-filtered, lyophilized (Endothelial Cell Growth Factor, Rind)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DABCO (1,4-diazabicyclo(2.2.2)octane)	Sigma, München
ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement)	Intracel Corporation, Rockville MD, USA
FBS (Fötales Kälberserum), steril	Sigma, USA
Glukose , D-(+)-Glukose	Sigma, USA
Glutamin , L-Glutamin	Serva Feinbiochemie, Heidelberg
HEPES , 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium , Schwein	Sigma, USA
Histopaque - 1077 Dichte 1.077 +/- 0.001 g/ml	Nalgene, Sigma Diagnostics, USA
Kollagenase 440 units/ mg, 1,6 FALGPA-units/ mg	Sigma, USA
Magnesiumchlorid , wasserfrei	Fluka Chemika, Schweiz
Meglumine-Diatrizoate	Sigma, USA
Percoll , Dichte 1.130+/- 0.005 g/ml, pH 8,9 +/- 0,3 bei 20 °C	Sigma, USA
RPMI 1640 Medium (mit L-Glutamin)	Gibco
Natrium-Diatrizoate (Wassergehalt 6,8 %) (3,5-Bis(acetylamino)-2,4,6-triiodo- benzoat-Natrium)	Sigma, USA
Triton x 100 , Alkylphenylpolyaethylenglykol	Merck
Trypsin EDTA (ohne Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺)	Gibco BRL

Färbe- und Nachweis-Substanzen/ Antikörper

Neutralisierende TNF- α -Immunglobulin G-Antikörper

R&D Systems, Wiesbaden

In Situ Cell Death Detection
(für TUNEL-Färbung)

Roche Diagnostics, Mannheim

Puffer, Lösungen und Medien

Sparmedium	
Antibiotic/ Antimycotic	5 ml
HEPES	7 ml
L-Glutamin	5 ml
Polymycin B	500 μ l
auf 500 ml mit RPMI 1640 Medium auffüllen, pH auf 7,4 einstellen, filtrieren	

HEPES-Grundlösung	
Aqua ad iniectabilia	1000 ml
HEPES ((N- (2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	238 g

HEPES-Puffer (ohne Calcium, zehnfach-konzentriert)	
Aqua ad iniectabilia	ad 1000 ml
Glucose	20,0 g
HEPES	23,8 g
MgCl ₂	1,9 g
NaCl	80,0 g
KCl	3,0 g
pH 7,4, gefiltert	

HEPES-Puffer (mit Calcium, zehnfach-konzentriert)	
Aqua ad iniectabilia	ad 1000 ml
CaCl ₂	3,68 g
Glucose	20,0 g
HEPES	23,8 g
MgCl ₂	1,9 g
NaCl	80,0 g
KCl	3,0 g
pH 7,4, gefiltert	

Kollagenaselösung	
Albumin (BSA)	5,0 g
CB-Puffer	ad 500 ml
Kollagenase	250 mg
zentrifugiert (3900 x g) und anschließend filtriert	

Vollmedium	
Antibiotic/ Antimycotic	5 ml
ECGF	28,0 mg
FBS	100 ml
HEPES	7 ml
L-Glutamin	5 ml
Polymycin B	500 µl
Porcine Heparin	30,0 mg
auf 500 ml mit RPMI 1640 Medium auffüllen, pH auf 7,4 einstellen, filtrieren	

Gelatine	
Aqua ad iniectabilia	100 ml
Gelatine	2,0 g
Polymycin B	200 µl
Aqua ad iniectabilia und Gelatine 1 Stunde bei 56°C erwärmt, Polymycin B hinzugefügt, filtriert	

Percoll-Gradienten	
PBS	2,2 ml
Percoll (90 %)	7,8 ml
Dichte von 1,098 g/ml	
PBS	3,0 ml
Percoll (90 %)	7,0 ml
Dichte von 1,090 g/ml	
PBS	3,7 ml
Percoll (90 %)	6,3 ml
Dichte von 1,081 g/ml	

Hypaque-Dichtegradient	
Aqua ad iniectabilia	50 ml
Meglumin Salz	30 g
NaCl	15 g
auffüllen mit Aqua ad in. auf ca. 400 ml, unter Erhitzen Lösen der Salze, Einstellen auf eine Dichte von 1,060 g/ml bei pH = 6,8 (bei 20°C), filtrieren, lichtgeschützt im Kühlschrank verwahren	

PBS-Puffer (isoton)	
Aqua ad iniectabilia	ad 1000 ml
Dikaliumhydrogenphosphat	0,57 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,34 g
Natriumchlorid	7,6 g
pH 7,4, dampfsterilisiert	

Permeabilisierungslösung (0,1 % Triton X-100/0,1 % NaCl)	
Natriumcitrat-Puffer	3 ml
Triton-Stammlösung)	1 ml
Natrium-Chlorid 0,9%	ad 100 ml

BSA-Lösung (1 %)	
BSA	0,5 g
Aqua ad iniectabilia	50 ml

DABCO-haltige Lösung	
DABCO	1200 mg
Glycerin (87 %)	100 ml
PBS	100 ml
Lagerung gekühlt und lichtgeschützt	

Literatur

- Abdalla, S.H. (1990).** Hematopoiesis in human malaria. *Blood Cells*. 16:401-16.
- Aosasa, S., Ono, S., Seki, S., Takayama, E., Tadakuma, T., Hiraide, H. & Mochizuki, H. (1998).** Inhibitory effect of protease inhibitor on endothelial cell activation. *J Surg Res*. 80:182-7.
- Bahra, P.S., Rainger, G.E., Wautier, J.L. & Nash, G.B. (2001).** Effects of pentoxifylline on the different steps during adhesion and transendothelial migration of flowing neutrophils. *Cell Biochem Funct*. 19:249-57.
- Baird, B.R., Cheronis, J.C., Sandhaus, R.A., Berger, E.M., White, C.W. & Repine, J.E. (1986).** O₂ metabolites and neutrophil elastase synergistically cause edematous injury in isolated rat lungs. *J Appl Physiol*. 61:2224-9.
- Bate, C.A., Taverne, J. & Playfair, J.H. (1988).** Malarial parasites induce TNF production by macrophages. *Immunology*. 64:227-31.
- Bate, C.A., Taverne, J. & Playfair, J.H. (1989).** Soluble malarial antigens are toxic and induce the production of tumour necrosis factor in vivo. *Immunology*. 66:600-5.
- Becker, B.F., Heindl, B., Kupatt, C. & Zahler, S. (2000).** Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol*. 89:160-7.
- Bevilacqua, M.P. (1993).** Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol*. 11:767-804.
- Bevilacqua, M.P., Nelson, R.M., Mannori, G. & Cecconi, O. (1994).** Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med*. 45:361-78.
- Boehme, M.W., Werle, E., Kommerell, B. & Raeth, U. (1994).** Serum levels of adhesion molecules and thrombomodulin as indicators of vascular injury in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Investig*. 72:598-603.
- Bombeli, T., Karsan, A., Tait, J.F. & Harlan J.M. (1997).** Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood*. 89:2429-42.
- Boogaerts, M.A., Malbrain, S., Meeus, P., van Hove, L. & Verhoef, G.E. (1990).** In vitro modulation of normal and diseased human neutrophil function by pentoxifylline. *Blut*. 61:60-5.
- Boyum, A. (1968).** Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 97:77-89.
- Burlacu, A., Jinga, V., Gafencu, A.V. & Simionescu, M. (2001).** Severity of oxidative stress generates different mechanisms of endothelial cell death. *Cell Tissue Res*. 306:409-16.

Casale, T.B. & Kaliner, M. (1982). A rapid method for isolation of human mononuclear cells free of significant platelet contamination. *J Immunol Methods*. 55:347-53.

Celada, A., Cruchaud, A. & Perrin, L.H. (1983a). Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes by human polymorphonuclear leukocytes. *J Parasitol*. 69:49-53.

Celada, A., Cruchaud, A. & Perrin, L.H. (1983b). Assessment of immune phagocytosis of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells by human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. A method for visualizing infected red blood cells ingested by phagocytes. *J Immunol Methods*. 63:263-71.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://www.cdc.gov>.

Chen, L., Zhang, Z. & Sendo, F. (2000). Neutrophils play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Clin Exp Immunol*. 120:125-33.

Coe, D.A., Freischlag, J.A., Johnson, D., Mudaliar, J.H., Kosciesza, S.A., Traul, D.K., Chiang, P.C., Cambria, R.A., Seabrook, G.R. & Towne, J.B. (1997). Pentoxifylline prevents endothelial damage due to ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res*. 67:21-5.

Combes, V., Rosenkranz, A.R., Redard, M., Pizzolato, G., Lepidi, H., Vestweber, D., Mayadas, T.N. & Grau, G.E. (2004). Pathogenic role of P-selectin in experimental cerebral malaria: importance of the endothelial compartment. *Am J Pathol*. 164:781-6.

Cotran, R.S. & Pober, J.S. (1990). Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury. *J Am Soc Nephrol*. 1:225-35.

Das, B.S. & Nanda, N.K. (1999). Evidence for erythrocyte lipid peroxidation in acute *falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 93:58-62.

de Kossodo, S. & Grau, G.E. (1993). Role of cytokines and adhesion molecules in malaria immunopathology. *Stem Cells*. 11:41-8.

de Pauw, B.E., Wessels, J.M., Geestman, E.J., Smeulders, J.B., Wagner, D.J. & Haanen, C. (1979). Non-selective lymphocyte isolation from human blood by nylon wool filtration and density centrifugation. *J Immunol Methods*. 25:291-5.

Deree, J., Lall, R., Melbostad, H., Grant, M., Hoyt, D.B. & Coimbra, R. (2006). Neutrophil degranulation and the effects of phosphodiesterase inhibition. *J Surg Res*. 133:22-8.

Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit e.V. <http://dtg.org/malaria.html>

Dörmer, P., Dietrich, M., Kern, P. & Horstmann, R.D. (1983). Ineffective erythropoiesis in acute human *P. falciparum* malaria. *Blut*. 46:279-88.

Dooley, D.C., Simpson, J.F. & Meryman, HAT. (1982). Isolation of large numbers of fully viable human neutrophils: a preparative technique using percoll density gradient centrifugation. *Exp Hematol* 10:591-599.

Elhassan, I.M., Hviid, L., Satti, G., Akerstrom, B., Jakobsen, P.H., Jensen, J.B. & Theander, T.G. (1994). Evidence of endothelial inflammation, T cell activation, and T cell reallocation in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 51:372-9.

Essien, E.M. & Ebhota, M.I. (1983). Platelet secretory activities in acute malaria (*Plasmodium falciparum*) infection. *Acta Haematol.* 70:183-8.

Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M. & O'Garra, A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 147:3815-22.

Garcia, F., Cebrian, M., Dgedge, M., Casademont, J., Bedini, J.L., Neves, O., Filella, X., Cinta Cid, M., Corachan, M. & Grau, J.M. (1999). Endothelial cell activation in muscle biopsy samples is related to clinical severity in human cerebral malaria. *J Infect Dis.* 179:475-83.

Goldring, J.P. & Nemaorani, S. (1999). Antimalarial drugs modulate the expression of monocyte receptors. *Int J Immunopharmacol.* 21:599-607.

Golenser, J., Kamyl, M., Tsafack, A., Marva, E., Cohen, A., Kitrossky, N. & Chevion, M. (1992). Correlation between destruction of malarial parasites by polymorphonuclear leucocytes and oxidative stress. *Free Radic Res Commun.* 17:249-62.

Gorczyca, W., Gong, J. & Darzynkiewicz, Z. (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 53:1945-51.

Grau, G.E., Piguet, P.F., Engers, H.D., Louis, J.A., Vassalli, P. & Lambert, P.H. (1986). L3T4⁺ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J Immunol.* 137:2348-54.

Grau, G.E., Fajardo, L.F., Piguet, P.F., Allet, B., Lambert, P.H. & Vassalli, P. (1987). Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science.* 237:1210-2.

Grau, G.E., Taylor, T.E., Molyneux, M.E., Wirima, J.J., Vassalli, P., Hommel, M. & Lambert, P.H. (1989a). Tumor necrosis factor and disease severity in children with *falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 320:1586-91.

Grau, G.E., Piguet, P.F., Vassalli, P. & Lambert, P.H. (1989b). Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. *Immunol Rev.* 112:49-70.

Grau, G.E., Pointaire, P., Piguet, P.F., Vesin, C., Rosen, H., Stamenkovic, I., Takei, F. & Vassalli, P. (1991). Late administration of monoclonal antibody to leukocyte function-antigen 1 abrogates incipient murine cerebral malaria. *Eur J Immunol.* 21:2265-7.

Grau, G.E., Tacchini-Cottier, F., Vesin, C., Milon, G., Lou, J.N., Piguet, P.F. & Juillard, P. (1993). TNF-induced microvascular pathology: active role for platelets and importance of the LFA-1/ICAM-1 interaction. *Eur Cytokine Netw.* 4:415-9.

Hassan, G.I., Gregory, U. & Maryam, H. (2004). Serum ascorbic acid concentration in patients with acute *Falciparum* malaria infection: possible significance. *Braz J Infect Dis.* 8:378-81.

Hemmer, C.J., Kern, P., Holst, F.G.E., Nawroth, P. & Dietrich, M. (1991). Neither heparin nor acetylsalicylic acid influence the clinical course in human *Plasmodium falciparum* malaria: a prospective randomized study. *Am J Trop Med Hyg.* 45:608-612.

Hemmer, C.J., Bierhaus, A., Riedesel, J. von, Gabat, S., Liliensiek, B., Pitronik, P., Lin, J., Grauer, A., Amiral, J., Ziegler, R., Schieffer, S., Kern, P., Seitz, R., Egbring, R., Dietrich, M. & Nawroth, P.P. (1994). Elevated thrombomodulin plasma levels as a result of endothelial involvement in *plasmodium falciparum* malaria. *Thromb Haemost.* 72:457-64.

Hemmer, C.J., Hort, G., Chiwakata, C.B., Seitz, R., Egbring, R., Gaus, W., Hogel, J., Hassemer, M., Nawroth, P.P., Kern, P. & Dietrich, M. (1997). Supportive pentoxifylline in *falciparum* malaria: no effect on tumor necrosis factor alpha levels or clinical outcome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Am J Trop Med Hyg.* 56:397-403.

Hemmer, C.J., Lehr, H.A., Westphal, K., Unverricht, M., Kratzius, M. & Reisinger, E.C. (2005). *Plasmodium falciparum* Malaria: reduction of endothelial cell apoptosis in vitro. *Infect Immun.* 73:1764-70.

Hermesen, C., Weil, T. van de, Mommers, E., Sauerwein, R. & Eling, W. (1997). Depletion of CD4+ or CD8+ T-cells prevents *Plasmodium berghei* induced cerebral malaria in end-stage disease. *Parasitology.* 114:7-12.

Ho, M. & White, N.J. (1999). Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol.* 276:1231-42.

Hoffman, S.L., Rustama, D., Punjabi, N.H., Surampaet, B., Sanjaya, B., Dimpudus, A.J., McKee, K.T. Jr., Paleologo, F.P., Campbell, J.R., Marwoto, H., et al. (1988). High-dose dexamethasone in quinine-treated patients with cerebral malaria: a double-blind, placebo-controlled trial. *J Infect Dis.* 158:325-31.

Holst, F.G., Hemmer, C.J., Foth, C., Seitz, R., Egbring, R. & Dietrich, M. (1999). Low levels of fibrin-stabilizing factor (factor XIII) in human *Plasmodium falciparum* malaria: correlation with clinical severity. *Am J Trop Med Hyg.* 60:99-104.

Horstmann, R.D., Dietrich, M., Bienzle, U. & Rasche, H. (1981). Malaria-induced thrombocytopenia. *Blut.* 42:157-64.

Horstmann, R.D. & Dietrich, M. (1985). Haemostatic alterations in malaria correlate to parasitaemia. *Blut.* 51:329-35.

Hviid, L. Theander, T.G., Elhassan, I.M. & Jensen, J.B. (1993). Increased plasma levels of soluble ICAM-1 and ELAM-1 (E-selectin) during acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunol Lett.* 36:51-8.

Jackson, M.H., Millar, A.M., Dawes, J. & Bell, D (1989). Neutrophil activation during cell preparation procedures. *Nucl. Med. Commun.* 10:901-4.

Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. & Minick, C.R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52:2745-56.

Jakobsen, P.H., Morris-Jones, S., Ronn, A., Hviid, L., Theander, T.G., Elhassan, I.M., Bygbjerg, I.C. & Greenwood, B.M. (1994). Increased plasma concentrations of sICAM-1, sVCAM-1 and sELAM-1 in patients with *Plasmodium falciparum* or *P. vivax* malaria and association with disease severity. *Immunology.* 83:665-9.

Jason, J., Archibald, L.K., Nwanyanwu, O.C., Bell, M., Buchanan, I., Larned, J., Kazembe, P.N., Dobbie, H., Parekh, B., Byrd, M.G., Eick, A., Han, A. & Jarvis, W.R. (2001). Cytokines and malaria parasitemia. *Clin Immunol.* 100:208-18.

Jonsson, B.M., Loffler, C. & Ohlsson, K. (1982). Human granulocyte elastase is inhibited by the urinary trypsin inhibitor. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 363:1167-75.

Kern, P., Hemmer, C.J., Damme, J. van, Gruss, H.J. & Dietrich, M. (1989). Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Med.* 87:139-43.

Kern, P., Dietrich, M., Hemmer, C. & Wellinghausen, N. (2000). Increased levels of soluble Fas ligand in serum in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* 68:3061-3.

Kharazmi, A. & Jepsen, S. (1984). Enhanced inhibition of in vitro multiplication of *Plasmodium falciparum* by stimulated human polymorphonuclear leucocytes. *Clin Exp Immunol.* 57:287-92.

Kharazmi, A., Hoiby, N. & Theander, T.G. (1987). *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia in a patient with severe *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 81:49-50.

Kremsner, P.G., Grundmann, H., Neifer, S., Sliwa, K., Sahlmuller, G., Hegenscheid, B. & Bienzle, U. (1991). Pentoxifylline prevents murine cerebral malaria. *J Infect Dis.* 164:605-8.

Kudoh, I., Ohtake, M., Nishizawa, H., Kurahashi, K., Hattori, S., Okumura, F., Pittet, J.F. & Wiener-Kronish, J. (1995). The effect of pentoxifylline on acid-induced alveolar epithelial injury. *Anesthesiology.* 82:531-41.

Kwiatkowski, D., Hill, A.V., Sambou, I., Twumasi, P., Castracane, J., Manogue, K.R., Cerami, A., Brewster, D.R. & Greenwood, B.M. (1990). TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet.* 336:1201-4.

Labat-Moleur, F., Guillermet, C., Lorimier, P., Robert, C., Lantuejoul, S., Brambilla, E. & Negoescu, A. (1998). TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem.* 46:327-34.

Langhorne, J., Cross, C., Seixas, E., Li, C. & Weid, T von der. (1998). A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:1730-4.

Levine, M., Conry-Cantilena, C., Wang, Y., Welch, R.W., Washko, P.W., Dhariwal, K.R., Park, J.B., Lazarev, A., Graumlich, J.F., King, J. & Cantilena L.R. (1996). Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:3704-9.

Looareesuwan, S., Wilairatana, P., Vannaphan, S., Wanaratana, V., Wenisch, C., Aikawa, M., Brittenham, G., Graninger, W. & Wernsdorfer, W.H. (1998). Pentoxifylline as an ancillary treatment for severe falciparum malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 58:348-53.

Lou, J., Lucas, R. & Grau, G.E. (2001). Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev.* 14:810-20.

Lüscher, T.F. & Barton, M. (1997). Biology of the endothelium. *Clin Cardiol.* 20:II-3-10.

MacPherson, G.G., Warrell, M.J., White, N.J., Looareesuwan, S. & Warrell, D.A. (1985). Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol.* 119:385-401.

Malhotra, K., Salmon, D., Le Bras, J., Savel, J. & Vilde, J.L. (1988). Stimulation of the chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes in various stages of the intraerythrocyte development of *Plasmodium falciparum*. *C R Seances Soc Biol Fil.* 182:270-8.

Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., Schie, R.C. van, LaFace, D.M. & Green, D.R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 182:1545-56.

May, J., Lell, B., Luty, A.J.F., Meyer, C.G. & Kremsner P.G.(2000). Plasma interleukin-10:Tumor necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *J Infect Dis.* 182:1570-3.

Mikawa, K., Akamatsu, H., Maekawa, N., Nishina, K., Obara, H., & Niwa, Y. (1994). Inhibitory effect of gabexate mesilate on human neutrophil function. *J Int Med Res.* 22:245-54.

Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K. & Doumbo, O.K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 415:673-9.

Muniz-Junqueira, M.I., Santos-Neto, L.L. dos & Tosta, C.E. (2001). Influence of tumor necrosis factor-alpha on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in vitro. *Cell Immunol.* 208:73-9.

Murata, A., Toda, H., Uda, K., Hayashida, H., Kato, T., Nakagawa, H., Yokoyama, S., Morishita, H., Yamakawa, T., Hirose, J., et al. (1994). Protective effect of recombinant neutrophil elastase inhibitor (R-020) on sepsis-induced organ injury in rat. *Inflammation.* 18:337-47.

Nakatani, K., Takeshita, S., Tsujimoto, H., Kawamura, Y. & Sekine, I. (2001). Inhibitory effect of serine protease inhibitors on neutrophil-mediated endothelial cell injury. *J Leukoc Biol.* 69:241-7.

Negoescu, A., Lorimier, P., Labat-Moleur, F., Drouet, C., Robert, C., Guillermet, C., Brambilla, C. & Brambilla, E. (1996). In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem.* 44:959-68.

Ockenhouse, C.F., Tegoshi, T., Maeno, Y., Benjamin, C., Ho, M., Kan, K.E., Thway, Y., Win, K., Aikawa, M. & Lobb, R.R. (1992). Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med.* 176:1183-9.

Oo, M.M., Aikawa, M., Than, T., Aye, T.M., Myint, P.T. Igarashi, I. & Schoene, W.C. (1987). Human cerebral malaria: a pathological study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 46:223-31.

Othoro, C., Lal, A.A., Nahlen, B., Koech, D., Orago, A.S. & Udhayakumar, V. (1999). A low interleukin-10 tumor necrosis factor- α ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *J Infect Dis.* 179:279-82.

Padayatty, S.J., Sun, H., Wang, Y., Riordan, H.D., Hewitt, S.M., Katz, A., Wesley, R.A. & Levine, M. (2004). Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med.* 140:533-7.

Patnaik, J.K., Das, B.S., Mishra, S.K., Mohanty, S., Satpathy, S.K. & Mohanty, D. (1994). Vascular clogging, mononuclear cell margination, and enhanced vascular permeability in the pathogenesis of human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 51:642-7.

Perkins, D.J., Weinberg, J.B. & Kremsner, P.G. (2000). Reduced interleukin-12 and transforming growth factor- β 1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. *J Infect Dis.* 182:988-92.

Perlmann, P. & Troye-Blomberg, M. (2002). Malaria and the immune system in humans. *Chem Immunol.* 80:229-42.

Pertoft, H., Hirtenstein, M. & Kajedal, L. (1979). Cell separations in a new density medium, p. 67-80. In E. Reid (ed.), *Cell populations, methodological surveys (B) Biochemistry*, vol. 9. Ellis Horwood Ltd., Chichester, West Sussex, United Kingdom.

Peyron, F., Burdin, N., Ringwald, P., Vuillez, J.P., Rousset, F. & Banchereau, J. (1994). High levels of circulating IL-10 in human malaria. *Clin Exp Immunol.* 95:300-3.

Pichyangkul, S., Saengkrai, P. & Webster, H.K. (1994). *Plasmodium falciparum* pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . *Am J Trop Med Hyg.* 51:430-5.

Pino, P., Vouldoukis, I., Kolb, J.P., Mahmoudi, N., Desportes-Livage, I., Bricaire, F., Danis, M., Dugas, B. & Mazier, D. (2003). Plasmodium falciparum--infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. *J Infect Dis.* 187:1283-90.

Pober, J.S. & Cotran R.S. (1990). The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation.* 50:537-44.

Pongponratn, E., Riganti, M., Punpoowong, B. & Aikawa, M. (1991). Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: a pathological study. *Am J Trop Med Hyg.* 44:168-75.

Prada, J., Graninger, W., Lehman, L.G., Metzger, W., Neifer, S., Zotter, G.M., Thalhammer, F., Bienzle, U. & Kremsner, P.G. (1995). Upregulation of ICAM-1, IL-1 and reactive oxygen intermediates (ROI) by exogenous antigens from Plasmodium falciparum parasites in vitro, and of sICAM-1 in the acute phase of malaria. *J Chemother.* 7:424-6.

Robaye, B., Mosselmans, R., Fiers, W., Dumont, J.E. & Galand, P. (1991). Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am. J. Pathol.* 138:447-53.

Rössig, L., Hoffmann, J., Hugel, B., Mallat, Z., Haase, A., Freyssinet, J.M., Tedgui, A., Aicher, A., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. (2001). Vitamin C inhibits endothelial cell apoptosis in congestive heart failure. *Circulation.* 104:2182-7.

Rubanyi, G.M. (1993). The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 22:1-14.

Schofield, L. & Hackett, F. (1993). Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med.* 177:145-53.

Shalaby, M.R., Aggarwal, B.B., Rinderknecht, E., Svedersky, L.P., Finkle, B.S. & Palladino, M.A. Jr. (1985). Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *J Immunol.* 135:2069-73.

Shalaby, M.R., Palladino, M.A. Jr., Hirabayashi, S.E., Eessalu, T.E., Lewis, G.D., Shepard, H.M. & Aggarwal, B.B. (1987). Receptor binding and activation of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor-alpha. *J Leukoc Biol.* 41:196-204.

Shimizu, Y., Newman, W., Gopal, T.V., Horgan, K.J., Graber, N., Beall, L.D., Seventer, G.A. van & Shaw, S. (1991). Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J Cell Biol.* 113:1203-12.

Shimizu, Y., Newman, W., Tanaka, Y. & Shaw, S. (1992). Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today.* 13:106-12.

Silamut, K., Phu, N.H., Whitty, C., Turner, G.D., Louwrier, K., Mai, N.T., Simpson, J.A., Hien, T.T. & White, N.J. (1999). A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *Am J Pathol.* 155:395-410.

Stief, T.W. & Heimbürger, N. (1988). Inactivation of serine proteinase inhibitors (serpins) in human plasma by reactive oxidants. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 369:1337-42.

Sugita, T., Watarida, S., Katsuyama, K., Nakajima, Y., Yamamoto, R. & Mori, A. (2002). Effect of a human urinary protease inhibitor (Ulinastatin) on respiratory function in pediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 43:437-40.

Sullivan, G.W., Carper, H.T., Novick, W.J. Jr & Mandell, G.L. (1988). Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline. *Infect Immun*. 56:1722-9.

Talbott, G.A., Sharar, S.R., Harlan, J.M. & Winn, R.K. (1994). Leukocyte-endothelial interactions and organ injury: the role of adhesion molecules. *New Horiz*. 2:545-54.

Tani, T., Aoki, H., Yoshioka, T., Lin, K.J. & Kodama, M. (1993). Treatment of septic shock with a protease inhibitor in a canine model: a prospective, randomized, controlled trial. *Crit Care Med*. 21:925-30.

Taverne, J., Tavernier, J., Fiers, W. & Playfair, J.H. (1987). Recombinant tumour necrosis factor inhibits malaria parasites in vivo but not in vitro. *Clin Exp Immunol*. 67:1-4.

Taverne, J., Bate, C.A., Sarkar, D.A., Meager, A., Rook, G.A. & Playfair, J.H. (1990a). Human and murine macrophages produce TNF in response to soluble antigens of *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol*. 12:33-43.

Taverne, J., Bate, C.A., Kwiatkowski, D., Jakobsen, P.H. & Playfair, J.H. (1990b). Two soluble antigens of *Plasmodium falciparum* induce tumor necrosis factor release from macrophages. *Infect Immun*. 58:2923-8.

Taylor-Robinson, A.W. & Phillips, R.S. (1994). B cells are required for the switch from Th1- to Th2-regulated immune responses to *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. *Infect Immun*. 62:2490-8.

Taylor-Robinson, A.W. & Phillips, R.S. (1996). Reconstitution of B-cell-depleted mice with B cells restores Th2-type immune responses during *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. *Infect Immun*. 64:366-70.

Thumwood, C.M., Hunt, N.H., Cowden, W.B. & Clark, I.A. (1989). Antioxidants can prevent cerebral malaria in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Br J Exp Pathol*. 70:293-303.

Turner, G.D., Morrison, H., Jones, M., Davis, T.M., Looareesuwan, S., Buley, I.D., Gatter, K.C., Newbold, C.I., Pukritayakamee, S. & Nagachinta, B. (1994). An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol*. 145:1057-69.

Turner, G.D., Ly, V.C., Nguyen, T.H., Tran, T.H., Nguyen, H.P., Bethell, D., Wyllie, S., Louwrier, K., Fox, S.B., Gatter, K.C., Day, N.P., Tran, T.H., White, N.J. & Berendt, A.R. (1998). Systemic endothelial activation occurs in both mild and severe malaria. Correlating dermal microvascular endothelial cell phenotype and soluble cell adhesion molecules with disease severity. *Am J Pathol.* 152:1477-87.

Udomsangpetch, R., Pipitaporn, B., Krishna, S., Angus, B., Pukrittayakamee, S., Bates, I., Suputtamongkol, Y., Kyle, D.E. & White, N.J. (1996). Antimalarial drugs reduce cytoadherence and rosetting *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis.* 173:691-8.

Uemura, M., Manabe, H., Yoshida, N., Fujita, N., Ochiai, J., Matsumoto, N., Takagi, T., Naito, Y. & Yoshikawa, T. (2002). Alpha-tocopherol prevents apoptosis of vascular endothelial cells via a mechanism exceeding that of mere antioxidation. *Eur. J. Pharmacol.*, 456:29-37.

Vanille, T. J., Misso, N.L., Phillips, M.J., Robisnon, B.W. & Thompson, P.J. (1994). Effects of different density gradient separation techniques on neutrophil function. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 54:385-91.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 184:39-51.

Vissers, M. C., Jester, S. A. & Fantone, J. C. (1988). Rapid purification of human peripheral blood monocytes by centrifugation through Ficoll-Hypaque and Sepracell-MN. *J Immunol Methods.* 110:203-7.

von der Weid, T., Honarvar, N. & Langhorne, J. (1996). Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection. *J Immunol.* 156:2510-6.

Warrell, D.A., Looareesuwan, S., Warrell, M.J., Kasemsarn, P., Intaraprasert, R., Bunnag, D. & Harinasuta, T. (1982). Dexamethasone proves deleterious in cerebral malaria. A double-blind trial in 100 comatose patients. *N Engl J Med.* 306:313-9.

Weatherall, D.J., Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., Doumbo, O.K., Casals-Pascual, C. & Roberts, D.J. (2002). Malaria and the red cell. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*:35-57.

Wenisch, C., Looareesuwan, S., Wilairatana, P., Parschalk, B., Vannapann, S., Wanaratana, V., Wernsdorfer, W. & Graninger, W. (1998). Effect of pentoxifylline on cytokine patterns in the therapy of complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 58:343-7.

Westlin, W.F. & Gimbrone, M.A. Jr. (1993). Neutrophil-mediated damage to human vascular endothelium. Role of cytokine activation. *Am J Pathol.* 142:117-28.

WHO, World Malaria Report, 2005, <http://rbm.who.int/wmr2005>

Williams, R.N., Paterson, C.A., Eakins, K.E. & Bhattacharjee, P. (1984). Ascorbic acid inhibits the activity of polymorphonuclear leukocytes in inflamed ocular tissues. *Exp Eye Res.* 39:261-5.

Williams, T.J. & Hellewell, P.G. (1992). Adhesion molecules involved in the microvascular inflammatory response. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146: S45-S50.

Yanez, D.M., Manning, D.D., Cooley, A.J., Weidanz, W.P. & Heyde, H.C. van der (1996). Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. *J Immunol.* 157:1620-4.

Abkürzungsverzeichnis

Anti-LFA-1-Mab	Monoklonaler Antikörper gegen das Leukozyten Funktions-assoziertes Antigen-1
BC	engl.: Buffy coat
BSA	engl.: Bovine Serum Albumine
BZ	Blutzucker
CO ₂	Kohlendioxid
DABCO	1,4-Diazabicyclo (2,2,2) Oktan
DAPI	4',6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid
DEET	Diethyltoluamid
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	engl.: desoxyribonucleid acid
dUTP	desoxy-Uridintriphosphat
ECGS	engl.: Endothelial Cell Growth Supplement
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiografie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	lat.: et alii
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor, engl.: Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoreszein-Isocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung, 9,80665 m/s ²
HEPES-Puffer	N- (2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure-Puffer
HNE	Humane Neutrophilen-Elastase
HUVEC	engl.: Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1	engl.: Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ISNT	engl.: in situ nick translation technique
LFA-1	engl.: leukocyte function antigen-1
M-CSF	Makrophagen-Koloniestimulierender-Faktor
M. tertiana	Malaria tertiana
M. tropica	Malaria tropica

M. quartana	Malaria quartana
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickoxid
P. falciparum	Plasmodium falciparum
P. vivax	Plasmodium vivax
P. malariae	Plasmodium malariae
P. ovale	Plasmodium ovale
P. berghei	Plasmodium berghei
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen
PBS	engl.: Phosphate Buffered Saline
PCR	engl.: polymerase chain reaction
PfHRP-2	engl.: Plasmodium falciparum-histidine rich protein 2
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
pLDH	parasitenspezifischen Laktatdehydrogenase
PMN	polymorphkernige neutrophile Leukozyten
POF	Pentoxifyllin
PS	Phosphatidylserin
QBC	engl.: Quantitative Buffy Coat
s	engl.: soluble
s.	siehe
sCD4	lösliche Form des Lymphozytenmarkers CD4
sCD8	lösliche Form des Lymphozytenmarkers CD8
sIL-2R	löslicher Interleukin-2-Rezeptor
sog.	sogenannte/er/es
Tab.	Tabelle
TdT	terminale Deoxynukleotidyl-Transferase
TM	Thrombomodulin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TUNEL	engl.: Terminal (Desoxyribosyl-Transferasemediated) UTP Nick End Labeling
UTP	Uridintriphosphat
UV-Licht	ultraviolettes Licht (Wellenlänge < 380 nm)

VCAM-1	engl.: Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Gefäß-Endothel-Wachstumsfaktor, engl.: Vascular Endothelial Cell Growth Factor
vs.	versus
vWF	von Willebrand-Faktor

Thesen

A. Zielstellung der Arbeit

A.1. Malaria ist die häufigste parasitäre Infektionskrankheit weltweit und führt zu 1,5-2,7 Millionen Todesfällen pro Jahr.

A.2. Von den vier humanpathogenen Malariaparasiten ist Plasmodium falciparum für die Mehrheit der Todesfälle verantwortlich.

A.3. Haupttodesursache sind das Versagen lebenswichtiger Organe (insbesondere Lunge, Nieren und Gehirn).

A.4. Ein zentraler Pathomechanismus der tödlichen Organkomplikationen ist die Schädigung von Gefäßendothel. Diese Schädigung bedingt Störungen der Permeabilität und der Rheologie und führt zum Multiorganversagen.

A.5. Ob Apoptose zum Endothelschaden und damit zum Organversagen beiträgt, ist bisher nicht hinreichend geklärt.

A.6. Ferner ist offen, welche Blutzellpopulationen des Wirtes in den Pathomechanismus des Endothelzellschadens involviert sind.

A.7. Als in-vitro-Modell wurden kultivierte Endothelzellen aus menschlichen Nabelschnurvenen (HUVEC) verwendet.

A.8. Diese wurden mit Patientenserum in An- oder Abwesenheit verschiedener Blutzellpopulationen untersucht.

A.9. Ferner wurde untersucht, ob die Apoptoserate von Endothelzellen in Anwesenheit von mononukleären Zellen oder Neutrophilen durch verschiedene Hemmstoffe (Ascorbinsäure, Tocopherol, Ulinastatin, Gabexat-Mesilat und Pentoxifyllin) verringert werden kann.

A.10. Mittels Siebeinsätzen wurde untersucht, ob zur Induktion von Apoptose in Endothelzellen durch Patientenserum und Neutrophile der direkte Kontakt zwischen Endothelzellen und Neutrophilen erforderlich ist.

A.11. Mittels neutralisierender Antikörper gegen TNF- α wurde untersucht, ob das im Patientenserum vorhandene TNF- α zur Apoptoseinduktion beiträgt.

B. *Hauptaussagen der Arbeit*

B.1. Im gewählten Modell induziert Serum von Patienten mit Malaria tropica die Apoptose von kultivierten Endothelzellen.

B.2. Diese apoptoseinduzierende Wirkung wurde durch Neutrophile wesentlich verstärkt.

B.3. Die Verstärkung der Apoptose durch Neutrophile wurde durch den Einsatz von Siebeinsätzen, die Endothelzellen und Neutrophile voneinander getrennt halten, verhindert.

B.4. Die Neutralisierung von TNF- α durch spezifische Antikörper reduzierte ebenfalls den verstärkenden Effekt von Neutrophilen auf die Endothelzellapoptose bei Malaria tropica.

B.5. In Gegenwart von neutrophilen Granulozyten zeigten Ascorbinsäure, Tocopherol und Ulinastatin eine dosisabhängige hemmende Wirkung auf die Apoptose von Endothelzellen bei Malaria tropica, nicht aber Gabexat-Mesilat und Pentoxifyllin.

B.6. Ascorbinsäure und Ulinastatin haben dabei in Kombination eine stärkere antiapoptotische Wirkung als jede Substanz für sich alleine.

B.7. Für mononukleäre Zellen ließ sich eine Verstärkung der apoptoseinduzierenden Wirkung von Serum eines Patienten mit Malaria tropica auf die Endothelzellapoptose nicht belegen.

B.8. Thrombozyten und nichtparasitierte Erythrozyten führten im angewandten Modell ebenfalls nicht zu einer Verstärkung der apoptoseinduzierenden Wirkung des Patientenserums.

C. *Wissenschaftliche Wertung der Ergebnisse*

C.1. Kultivierte Endothelzellen menschlicher Nabelschnurvenen (HUVEC) sind als in-vitro-Modell des Gefäßendothels etabliert. Sie spiegeln wichtige in-vivo-Eigenschaften des Gefäßendothels in vitro wieder.

C.2. Zur Aufreinigung der Blutzellpopulationen wurden Verfahren bevorzugt, bei denen eine vorzeitige Aktivierung der Zellen während der Isolation vermieden wird und bei denen die zu untersuchenden Zellen in hinreichender Reinheit isoliert werden konnten.

C.3. Das zum Apoptosenachweis verwendete TUNEL-Verfahren ist besonders zum Nachweis von Apoptose in Zellkulturen geeignet und zeichnet sich durch die Möglichkeit einer direkten Auswertung einzelner Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie aus.

C.4. Diese Arbeit zeigt, dass das verwendete in-vitro-Verfahren zur Untersuchung der apoptosehemmenden Wirkung von Pharmaka an Endothelzellen verwendet werden kann.

C.5. Erstmals wurden in einer Versuchsreihe der Einfluss verschiedener in der Literatur diskutierter Blutzellpopulationen auf die Endothelschädigung bei Malaria tropica untersucht.

C.6. Von den untersuchten Blutzellen zeigen allein Neutrophile einen eindeutigen verstärkenden Effekt auf die Apoptoseinduktion durch Patientenserum (Malaria tropica).

C.7. Die apoptoseinduzierende Wirkung des Patientenserums ist wenigstens zum Teil abhängig von TNF- α .

C.8. Die apoptoseinduzierende Wirkung des Patientenserums scheint durch den direkten Kontakt von Neutrophilen und Endothelzellen verstärkt zu werden.

D. *Allgemeine Bedeutung der Ergebnisse*

D.1. Die Schädigung von Endothelzellen durch Apoptose ist bei Malaria tropica wahrscheinlich ein wesentlicher Pathomechanismus des tödlichen Organversagens.

D.2. Die Identifikation des Schädigungsmechanismus ist die Voraussetzung für die gezielte Suche nach pharmakologischen Angriffspunkten.

D.3. Diese Arbeit zeigt mögliche Angriffspunkte auf, nämlich die Aktivierung der Neutrophilen durch TNF- α im Patientenserum und die Interaktion von Neutrophilen und Endothelzellen.

D.4. Aufgrund von pathophysiologischen und therapeutischen Überlegungen wurden Pharmaka getestet, die Sekretionsprodukte von Neutrophilen neutralisieren und die zur Anwendung beim Menschen in mindestens einem Land der Welt zugelassen sind.

D.5. Zu den meisten der verwendeten Pharmaka liegen noch keine klinischen Studien bei Malariapatienten vor. Insbesondere die Untersuchung der Effekte von Ascorbinsäure und Ulinastatin in der klinischen Anwendung bei Malaria tropica erscheint sinnvoll.

D.6. Weitere pharmakologische Wirkstoffe und Targets können in weiteren Versuchsreihen identifiziert werden.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe.

Eisenach, 10.03.2008

(Manja Kratzius)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Reisinger für die Möglichkeit in seiner Forschungsgruppe erste wissenschaftliche Schritte zu gehen.

Herrn Dr. med. habil. Hemmer danke ich für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas, die Einführung in die wissenschaftliche Arbeitsführung und seinen fortwährenden Rat.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Malaria und des parasitologischen Labors für die angenehme Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit danken. Besonderer Dank geht an Frau Dr. Diana Riebold für die gute Organisation der Abläufe im Labor und ihre freundliche und offene Art sowie Kathi Westphal und Marcus Unverricht für erste Hilfestellungen und die gute Teamarbeit im Labor. Herrn Dr. Möller wünsche ich viel Freude mit seiner zweiten Passion, der Ornithologie.

Der Frauenklinik der Universität Rostock und der gynäkologischen Abteilung des Südstadt-Klinikums der Hansestadt Rostock danke ich für die hervorragende Kooperation. Mein herzlicher Dank gilt allen Eltern, die uns die Verwendung der Nabelschnüre gestattet und somit die Gewinnung von HUVEC ermöglicht haben.

Meiner Familie und insbesondere meinen Eltern möchte ich für die unermüdliche Unterstützung während dieser Jahre danken. Sie haben mich in allen Umbrüchen und Veränderungen gestärkt und mir so meine persönliche und berufliche Entfaltung ermöglicht.

Meinen Freunden ein herzliches Dankeschön für Ihre anhaltende Empathie.

Meinem lieben Christopher danke ich für seine Unterstützung und Anregung bei der optischen Gestaltung, v.a. aber für seine unermüdliche Geduld, seine fortwährende Motivation und Zuversicht.